Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Remmer
und der
Abteilung Molekulare Toxikologie
des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. W. Kunz

Quantitative und mechanistische Aspekte der fremdstoffinduzierten Tumorpromotion in der Leber

Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens präneoplastischer ATPase-freier Zellareale von Carcinogen- und Cocarcinogen-Dosen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dietrich Ernst Lorke
aus Wuppertal
– 1983 –

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. H. Remmer
und der
Abteilung Molekulare Toxikologie
des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. W. Kunz

Quantitative und mechanistische Aspekte der fremdstoffinduzierten Tumorpromotion in der Leber

Abhängigkeit des Wachstumsverhaltens präneoplastischer ATPase-freier Zellareale von Carcinogen- und Cocarcinogen-Dosen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dietrich Ernst Lorke
aus Wuppertal
– 1983 –

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. nat. Dr. med. H. Ritter
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Kunz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. J. Werringloer

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Januar 1978 bis Juli 1982 in der Abteilung für Molekulare Toxikologie am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg.

Herrn Prof. Dr. W. Kunz danke ich herzlich für die freundliche Überlassung des Themas und die Anleitung während der Durchführung der Arbeit.

Mein Dank gilt weiter Frau Dr. R. Rickart-Port und Herrn Dr. R. Port für die vielen guten Ratschläge, die zum Abschluß dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders möchte ich mich für die technische Unterstützung bei Frau H. von Graff, Frau J. Hummel, Frau J. Mahr, Frau G. Robinson und Herrn R. Schmidt bedanken.

Allen Mitarbeitern dieser Abteilung danke ich außerdem für die gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

ATPase	Adenosin- Triphosphatase
AAF	Acetyl- Amino- Fluoren
DÄNA	Di- Äthyl- Nitrosamin
DMBA	7, 12- Di- Methyl- Benzanthracen
γ- GT	γ- Glutamyl- Transpeptidase, γ- Glutamyl- Transferase (EC 2.3.2.2.)
I	Inselzahl
KG	Körpergewicht
MOP	Manuell Optischer Bildanalysator
NNM	N- Nitroso- Morpholin
PB = Phenobarb.	Phenobarbital- Na
t2, t6 etc.	Zeitpunkt2, bzw. 6 Wochen nach Ende der Carcinogen- Applikation
TFA	Tri- Fluor- Essigsäure, Trifluoracetat
TPA	2o- Tetra- Decanoyl- Phorbol- 13- Acetat

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Chemikalien	10
2.2.	Versuchstiere und Tierhaltung	10
2.3.	Behandlung der Tiere	11
2.3.1.	Applikation der Carcinogene	11
2.3.2.	Applikation der lebervergrößernden Substanzen	12
2.4.	Organentnahme	12
2.5.	Enzymhistochemische Darstellungen	13
2.5.1.	ATPase- Nachweis nach Wachstein und Meisel	13
2.5.2.	γ- Glutamyl- Transpeptidase- Nachweis nach Lojda	14
2.6.	Ausmessen der Schnitte	16
2.6.1.	Integrationsplatte	16
2.6.2.	Manuell optischer Bildanalysator	17
2.7.	Auswertverfahren	18
3.	ERGEBNISSE	20
3.1.	Vergleich der Wirkung von Phenobarbital auf das Inselwachstum mit der Wirkung anderer lebervergrößernder Substanzen	21
3.2.	Der zeitliche Ablauf des Inselwachstums in Abhängigkeit von der Carcinogen- Dosis	28
3.2.1.	Inselentwicklung ohne Phenobarbital-Einwirkung	28
3.2.2.	Dosis- Zeit- Wirkungsbeziehung nach diskontinuierlicher DÄNA- Applikation	34
3.2.3.	Einfluß von Phenobarbital- Nachbehandlung auf den Zeit- Wirkungsverlauf des Inselwachstums nach Initiierung mit variabler Carcinogen- Dosis	37

3.2.4.	Beeinflussung der DÄNA- Dosis- Zeit-Wirkungskurve durch Phenobarbital	40
3.3.	Die Wirkung von Phenobarbital bei Applikation 12 Wochen nach Absetzen des Carcinogens	45
3.4.	Intermittierende Phenobarbital- Nachbehandlung	47
3.5.	Dosisabhängigkeit der Phenobarbital-Wirkung auf das Inselwachstum	51
4.	DISKUSSION	64
4.1.	Zur Entstehung ATPase- freier Areale	68
4. 2.	Zum Wachstumsverlauf ATPase- freier Inseln und seiner Beeinflussung durch Phenobarbital	71
4. 3.	Zur Dosis- Zeit- Wirkungsbeziehung von Carcinogenen und Promotoren	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	83

1. EINLEITUNG

Viele Fremdstoffe mit unterschiedlichen chemischen und pharmakologischen Eigenschaften verursachen bei längerdauernder Einwirkung im Tierversuch eine bis zur Verdoppelung des Organvolumens führende Lebervergrößerung. Dieser Effekt wurde bei weit über der Hälfte aller Substanzen gefunden, die einer chronischen Toxizitätsprüfung unterzogen worden waren, weil ihre Verwendung in Arzneimitteln, Lebensmittelzusätzen, Kosmetika oder Präparaten anderer, zur menschlichen Exposition führender Anwendungsbereiche vorgesehen war. Die toxikologische Bewertung dieses Phänomens ist deshalb von großem Allgemeininteresse (Golberg et al., 1965; Kunz et al., 1966; Conney, 1967; Schulte-Hermann, 1974).

Umfangreiche Untersuchungen zur Beurteilung dieser Frage haben ergeben, daß alle eine Lebervergrößerung auslösenden Substanzen initial differente spezifische Enzymsysteme induzieren und sich dadurch in zwei Stoffgruppen einordnen lassen. Eine erste sehr umfangreiche Gruppe, der viele Pharmaka wie u.a. Babiturate, Benzodiazepine und Steroide angehören, induziert primär Enzyme des mikrosomalen Monooxigenasesystems (Remmer et al., 1959, 1965; Conney, 1967). Die zweite vor allem Organohalogene umfassende Gruppe, zu der u.a. Clofibrat und Halothan gehören, induziert initial peroxysomale Enzyme sowie Enzyme des intrazellulären Redoxtransfers. Die darauf folgende Organvergrößerung geht mit einer annähernd proportionierten Zunahme von Enzym- und Strukturproteinen, Phospholipoiden und Nukleinsäuren einher. Als cytologisches Äquivalent findet sich wie bei dem normalen Wachstum der Leber vorwiegend eine Zellhypertrophie mit Erhöhung des Ploidiegrades und zu einem geringeren Ausmaß auch eine Zellhyperplasie.

Da bei der induzierten Lebervergrößerung alle morphologischen und funktionellen Anzeichen einer Schädigung fehlen und sich die strukturellen und biochemischen Veränderungen bei Absetzen der Substanz vollständig zurückbilden, wurde die Organvergrößerung allgemein als Adaptation an eine erhöhte funktionelle Belastung angesehen, der keine toxikologische Bedeutung zukommt.
Zumindest die allgemeine Gültigkeit dieser Wertung ist jedoch in den letzten Jahren aufgrund tierexperimenteller Carcinogenitätsuntersuchungen zunehmend in Frage gestellt worden. Bei lebenslanger Zufuhr sehr hoher Dosen wurde bei einigen, wegen ihrer verbreiteten Anwendung besonders interessierenden Stoffen, eine sichere Erhöhung der Lebertumorrate nachgewiesen. So traten bei CF1- und C3H-Mäusen bei chronischer Zufuhr von DDT, Dieldrin und Phenobarbital mit dem Futter signifikant vermehrt hepatozelluläre Tumoren auf (Tomatis et al., 1972; Thorpe et al., 1973; Peraino et al., 1973). Bei Wistarratten steigerte chronische Verfütterung hoher DDT- und Phenobarbitaldosen ebenfalls die Inzidenz hepatischer Tumoren (Rossi et al., 1977). Bei Untersuchungen an Sprague-Dawley-Ratten oder NMRI-Mäusen traten dagegen bei exakt vergleichbarer Applikation dieser Fremdstoffe keine Lebertumoren auf (Kunz et al., 1968; Peraino et al., 1971). Auch bei Untersuchungen mit anderen Tierspezies wurde keine Erhöhung der Lebertumorrate gefunden.
Die sich widersprechenden Ergebnisse dieser Untersuchungen werden bis heute unterschiedlich interpretiert. Es ist einmal denkbar, daß die Substanzen eine sehr schwache carcinogene Wirksamkeit besitzen, die nur bei besonders empfindlich reagierenden Tierspezies erkannt werden kann. Ebenso möglich erscheint jedoch, daß die Stoffe keine echte carcinogene Eigenwirkung besitzen, sondern als Cocarcinogene die Wirkung anderer endogener oder exogener carcinogener Noxen potenzieren. Auf diese Möglichkeit deutet vor allem die Tat-

sache hin, daß eine tumorfördernde Wirkung der Fremdstoffe nur bei den Ratten- und Mäusestämmen beobachtet wurde, die schon eine hohe spontane Lebertumorrate besitzen. Stämme mit fehlender oder sehr niedriger Spontantumorrate entwickelten auch nach Applikation hoher Fremdstoffdosen keine Lebertumoren.
Die Annahme einer cocarcinogenen Wirkung der Fremdstoffe wurde durch experimentelle Untersuchungen Perainos gestützt. Bei Sprague-Dawley-Ratten, die spontan keine Lebertumoren entwickeln und bei denen auch nach Applikation hoher Phenobarbitaldosen alleine keine Hepatome auftraten, führte eine Phenobarbitalbehandlung nach vorausgegangener Applikation sehr geringer, unterschwelliger Dosen des Carcinogens Azetylaminofluoren (AAF) zu einer starken Erhöhung der Lebertumorrate (Peraino et al., 1971). Peraino schloß aus diesen Resultaten, daß Phenobarbital keine initiierende Wirkung besitze, sondern im Sinne des Zweistufenmodells der Carcinogenese als Promotor nur die maligne Transformation von Zellen beschleunige, die durch vorausgegangene Einwirkung exogener oder endogener Carcinogene initiiert worden waren.
Das Zweistufenkonzept der Tumorentstehung wurde von Berenblum aufgrund von Untersuchungen über die Hautkrebsentstehung bei Mäusen entwickelt (Berenblum, 1941). Er beobachtete, daß bei Aufpinseln sehr geringer, nicht mehr zur Tumormanifestation führender Mengen von Dimethylbenzanthrazen (DMBA) auf die Mäusehaut eine nachfolgende lokale Behandlung mit dem entzündungserregenden Crotonöl zur Ausbildung von Papillomen und Carcinomen führte. Da die gleiche Crotonöl-Behandlung ohne vorausgegangene Carcinogeneinwirkung nicht in der Lage war, Tumoren hervorzurufen, folgerte er, daß die Krebsentstehung in zwei Phasen ablaufe. Der erste unerläßliche Schritt, die "Initiation" durch das eigentliche Carcinogen, besteht in einer irreversiblen Veränderung des genetischen Materials der Zelle. Die "ini-

tiierte" Zelle unterscheidet sich phänotypisch nicht von den sie umgebenden normalen Zellen und wird daher auch als latente oder potentielle Tumorzelle bezeichnet. Durch die nachfolgende Einwirkung der selbst nicht carcinogenen Promotoren werden dann in einem zweiten Schritt diese initiierten Zellen in neoplastische Zellen überführt, aus denen sich die Tumoren entwickeln.

Abb. 1: Schema der 2-Stufen Carcinogenese (nach Hecker)

Die promovierend wirkende chemische Komponente des Crotonöls wurde von Hecker und Mitarbeitern isoliert und als 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) charakterisiert (Hecker, 1971). Dieser Phorbolester ist ebenfalls Träger der entzündungserregenden und der hyperplasiogenen Wirkung des Crotonöls. Die promovierende Wirkung hat die Auslösung dieser zellulären Prozesse zur Voraussetzung. Beide Initialreaktionen, d.h. Entzündungserregung und Zellproliferation erfordern eine bestimmte TPA-Konzentration und besitzen eine zeitlich begrenzte Dauer. Sie sind voll reversibel und bei intermittierender Auslösung nicht additiv. Daraus ergibt sich, daß auch für die promovierende Wirkung eine Grenzkonzentration der effektiven Substanz besteht,

bei deren Unterschreiten keine Wirkung mehr auftritt und auch kein summationsfähiger Wirkungsrest verbleibt. Es besteht daher ein grundlegender Unterschied zu der initiierenden Wirkung der chemischen Carcinogene. Diese besitzen die Fähigkeit durch Wechselwirkungen mit Komponenten des genetischen Apparates Zellen irreversibel zu verändern. Dadurch entstehen somatische Mutationen, die bei der Zellteilung weitergegeben werden. Wegen ihrer Irreversibilität können die genotoxischen Effekte zeitlich weit auseinander liegender Carcinogeneinwirkungen in der Zelle addiert werden.
Ohne nähere Kenntnis dieser molekular-biologischen Grundlagen beschrieb Druckrey bereits 1948 erstmals, daß die Wirkung von Carcinogenen pharmakologisch dadurch charakterisiert ist, daß die Primäreffekte aller Einzeldosen während der ganzen Lebenszeit fortbestehen und sich summieren, die Krebsmanifestation also eine Funktion von Einzeldosen und Zeit, d.h. der aufgenommenen Gesamtdosis ist. Für die Wirkung von Carcinogenen besteht deshalb eine gesetzmäßige Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung. Für Buttergelb (4-DAB) mit dem Druckrey seine ersten Untersuchungen durchführte, war die zur Tumorbildung erforderliche Gesamtdosis immer konstant, gleichgültig, ob diese in mehreren kleinen oder wenigen großen Dosen aufgenommen wurde. Es besteht in diesem Fall also eine reine Additionswirkung, die durch die Formel $d \times t = const.$ beschrieben werden kann. Bei der Untersuchung anderer Carcinogene zeigte sich dann, daß bei gleicher Gesamtdosis kleine Tagesdosen über längere Zeit gegeben, eine größere Wirkung haben als die kurzfristige Gabe großer Einzeldosen. Bei doppeltlogarithmischer Aufzeichnung des Wirkungsparameters TD 50 ergab sich ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen täglich aufgenommener Einzeldosis d und der Zeit bis zur Tumormanifestation t, deren Steigung jedoch größer als 45° war.

Die Funktion lautete hier d x t^n = const.. Der Zeitexponent n, der Tangens des Steigungswinkels, ist eine für jedes Carcinogen charakteristische Konstante. Er ist ein Ausdruck für die Beschleunigung der Tumormanifestation durch die Zeit; Druckrey nannte dieses Phänomen "Zeitverstärkerwirkung".

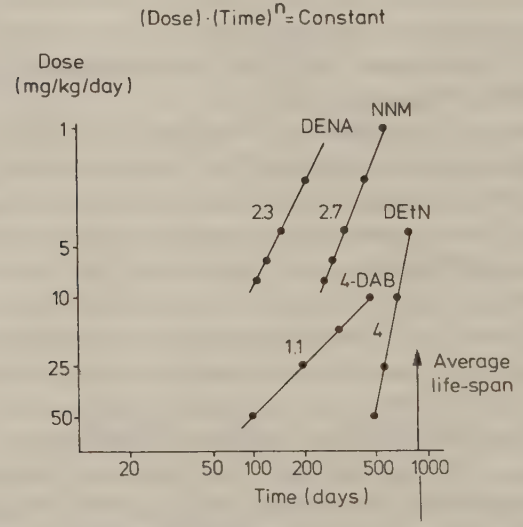


Abb. 2: Dosis- Zeit- Wirkungsbeziehungen bei kontinuierlicher Applikation verschiedener Carcinogene (nach Druckrey 1967, Kunz 1982)

Nach diesen Wirkungs-Gesetzen können selbst kleinste Carcinogendosen durch Addition im Laufe des Lebens letztlich zur Tumorbildung führen. Da die zellbiologische Wirkung auch differenter Carcinogene identisch ist, kann die zur Tumorentstehung erforderliche Gesamtwirkung nicht nur durch Summation kleiner Einzeldosen eines einzigen, sondern auch durch Addition der Wirkung verschiedener Carcinogene erreicht werden, sofern die gleiche Targetzelle

getroffen wird. Da eine Schwellendosis schon für ein einzelnes Carcinogen nicht definierbar ist und wir zudem die Zahl carcinogener Stoffe, die zur menschlichen Exposition gelangen, nicht kennen, ist unbedingt zu fordern, daß die Aufnahme selbst kleinster Mengen von Substanzen mit erwiesener Carcinogenität weitmöglichst vermieden werden muß.

Aus den völlig andersartigen Wirkungsprinzipien und der differenten Dosisabhängigkeit promovierender Substanzen geht hervor, daß diese Forderung für sie nicht mit gleicher Ausschließlichkeit erhoben werden kann. Die Entscheidung, ob eine Substanz carcinogen oder promovierend wirkt, besitzt deshalb nicht nur theoretisches Interesse, sondern wegen der unterschiedlichen toxikologischen Konsequenzen auch außerordentlich praktische Bedeutung für die Risikobeurteilung von Fremdstoffen. Eine experimentelle Unterscheidung erscheint aufgrund der differenten Initialeffekte und Wirkungsweisen theoretisch einfach, ist in Wirklichkeit jedoch mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden und oft unmöglich.

Die molekularen und zellulären Initialwirkungen von Carcinogenen können zwar durch den Nachweis der kovalenten Bindung des Carcinogens an DNS oder die Erfassung dadurch bedingter DNS-Strangbrüche experimentell ermittelt werden. Derartige Veränderungen ließen sich für einige der noch unterschiedlich bewerteten Substanzen wie Phenobarbital, Dieldrin und Clofibrat nicht nachweisen (Swenberg et al., 1976; Schwarz et al., 1979). Diese Ergebnisse sprechen zwar gegen eine carcinogene Wirkung, werden jedoch nicht als sichere Beweise akzeptiert, weil ihnen entgegenzuhalten ist, daß die angewandten Methoden zu unempfindlich sind, um die möglicherweise nur wenige kritische DNS-Anteile betreffenden Läsionen zu erfassen. Der umgekehrte Versuch, eine ausschließlich promovierende Wirkung der Stoffe zu beweisen, begegnet ebenso großen Schwierigkeiten. Entscheidungskriterium ist hier, daß die allei-

nige Einwirkung des Promotors im Tierexperiment nicht zur Tumorbildung führten dürfte. Zur Überprüfung dieser theoretischen Forderung lassen sich jedoch gerade bei der Beurteilung leberwirksamer Stoffe in der Praxis die geeigneten experimentellen Voraussetzungen nur schwer schaffen. Eine Initiation durch Carcinogene in der Nahrung, durch Strahleneinwirkung, durch endogene und virale Faktoren kann nie mit Sicherheit ausgeschaltet werden. Die dadurch bedingte "Spontantumorrate" muß zwangsläufig auch bei nachfolgender Einwirkung einer ausschließlich promovierenden Substanz erhöht werden. Die alleinige Betrachtung der bei lebenslanger Zufuhr eines Stoffes auftretenden Tumorinzidenz ist deshalb nicht geeignet, zwischen carcinogener und promovierender Wirkung zu differenzieren. Auf der Basis der von Druckrey ermittelten, heute allgemein akzeptierten quantitativen Gesetzen der chemischen Carcinogenese müßte eine Unterscheidung beider Mechanismen jedoch durch detailliertere Analysen der Dosis- Zeit- Wirkungsbeziehungen möglich sein. Abweichend von dem in Abb. 2 dargestellten linearen Verlauf der Carcinogen- Wirkung sollte die Promotor- Wirkung bei gleicher Auftragung von Dosis und Zeit eine nicht lineare Charakteristik aufweisen.
Dabei ergeben sich allerdings methodische Schwierigkeiten, weil es hierfür nötig ist, die Wirkung einer Substanz in großen, vor allem auch die niedrigen Dosen umfassenden Bereich zu erfassen. Die Verwendung des Tumortods oder des Auftretens von tastbaren Tumoren erfordert bei schwachen Carcinogenen die Zufuhr sehr hoher Dosen, um das Ereignis erfassen zu können. In niedrigen Dosisbereichen überschreitet die theoretisch benötigte Zeit bis zur Tumormanifestation die Lebenszeit der Tiere. Es ist deshalb erforderlich, einen Wirkungsparameter als Zielgröße zu verwenden, der es erlaubt, schon zu einem frühen Zeitpunkt und bei Anwendung niedriger Dosierungen die carcinogene Wirkung quantitativ erfassen zu können.

Nach den Ergebnissen verschiedener Untersucher wird diese Voraussetzung durch morphometrische Analysen ATPase- freier Areale erfüllt (Schauer et al. 1968, Rabes et al. 1972, Scherer et al. 1972, 1975, Schieferstein et al. 1974). Diese als Inseln bezeichneten enzymfreien Zellherde, die zuerst 1964 von Friedrich- Freksa beschrieben wurden, treten nach Carcinogen- Zufuhr schon sehr frühzeitig auf und stellen präneoplastische Veränderungen dar. Zwischen Effektivität und Dosis eines Carcinogens und diesen Enzymdefekten bestehen definierte quantitative Beziehungen. Unter Zugrundelegung des Wirkungsparameters Inselfläche ergibt sich für ein bestimmtes Carcinogen die gleiche Dosis- Zeit- Wirkungs- Beziehung wie bei den zu einem erheblich späteren Zeitpunkt auftretenden Parametern Tumor- Tastbefund und Tumortod (Kunz et al. 1978).

Ziel dieser Arbeit ist, am Beispiel von Phenobarbital den Einfluß lebervergrößernder Substanzen auf die Entstehung und das Wachstumsverhalten Nitrosamin- induzierter enzymfreier Areale zu untersuchen. Durch Variation von Dosis, Zeitpunkt und Dauer der Phenobarbital- Applikation soll die Frage beantwortet werden, ob seine Wirkung den Charakter eines Carcinogens oder eines Promotors trägt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Di-äthyl-Nitrosamin	Merck Schuchardt
N-Nitroso-Morpholin	Merck Schuchardt
Phenobarbital-Na	Bayer AG, Leverkusen
Clofibrat	ICI-GmbH, Plankstadt
Trifluoressigsäure	Merck AG, Darmstadt
Adenosin-Triphosphat	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Entellan^{R}	Merck AG, Darmstadt
γ-L-Glutamyl-Naphtylamid	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Basisches Fuchsin	Merck AG, Darmstadt
Kaisers Glyzerin-Gelatine	Merck AG, Darmstadt

2.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten in den ersten Versuchsreihen weibliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Ivanovas, Kisslegg (Allgäu). Ihr Alter betrug bei Versuchsbeginn 7-8 Wochen bei einem Gewicht von 150-190 g. Für den letzten Versuch benutzten wir adulte männliche Lewis-Ratten aus der Versuchsanstalt für Versuchstierkunde, Hannover, die zu Versuchsbeginn 180-220 g wogen.

Haltung: Zu je 2-3 Tieren in Makrolon-Käfigen bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus. Als Futter erhielten sie Altromine-Standardfutter der Firma Altrogge, Brackwede, und H_2O ad libitum.

2.3 Behandlung der Tiere

2.3.1 Applikation der Carcinogene:

- Bei den Versuchen, in denen den Tieren eine genau definierte Carcinogen-Menge zugeführt werden sollte, applizierten wir das DÄNA per Schlundsonde: 2,4 oder 8 mg DÄNA/kg KG x die, fünfmal pro Woche über 2 1/2 Wochen.
  Das Di-Äthyl-Nitrosamin wurde als 98%ige Standardlösung in Kälte unter Lichtabschluß stabil gehalten und durch wöchentliche 0,2/0,4/0,8%ige Verdünnung für den Versuch zubereitet. Die Stabilität der verdünnten Lösung, welche ebenfalls im Kühlschrank in getönten Flaschen aufbewahrt wurde, wurde durch die Aufnahme von UV-Spektren überprüft. Täglich applizierten wir per Schlundsonde 0,001 ml dieser verdünnten Lösung pro Gramm Tier, das heißt 0,150-0,190 ml pro Tier.
- In den übrigen Versuchen erhielten die Tiere das DÄNA 28 Tage lang im Trinkwasser. Die Trinkwassermenge wurde anfangs zweimal, später einmal wöchentlich gemessen. Bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 25 ml/die x Tier und einer DÄNA-Konzentration im Trinkwasser von 60 mg/l nahmen die Tiere in den 28 Tagen 35-45 mg DÄNA zu sich, das entspricht bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200 g einer täglichen DÄNA-Dosierung von 6,5-8 mg/kg KG x die.
- In der letzten Versuchsreihe erhielten die Tiere über 7 Wochen N-Nitroso-Morpholin in 120 ppm-Lösung im Trinkwasser zugeführt; dies entspricht einer Dosierung von 12 mg/kg KG x die. Die Verdünnung wurde zweimal wöchentlich aus der 99%igen Stammlösung hergestellt.

2.3.2 Applikation der lebervergrößernden Substanzen:

- Phenobarbital: in den ersten Versuchen als 0,1%ige Lösung im Trinkwasser, wobei die Trinkmenge alle 2-3 Tage gemessen wurde. Bei einer durchschnittlichen Trinkmenge von 18 ml/die entspricht dies einer Dosierung von 90 mg/kg KG x die.
  Im Phenobarbital-Dosis-Versuch als 7,5/75/750 ppm-Lösung im Trinkwasser, woraus sich eine Dosierung von ca. 0,75/7,5/75 mg/kg KH x die ergibt.
- Trifluoressigsäure: Im Trinkwasser als 0,1%ige Lösung, die mit 1 n NaOH-Lösung auf einen PH von 7 eingestellt war. Hieraus errechnet sich bei einer Trinkmenge in der Größenordnung wie bei Phenobarbital eine Dosierung von 90 mg/kg KG.
- Clofibrat: Diese fettlösliche Substanz mußte intraperitoneal injiziert werden. Zu Beginn: 3 Tage lang täglich 0,1 ml der konzentrierten Substanz pro Tier. Später: dreimal wöchentlich 0,125 ml/Tier. Hieraus resultiert eine Dosis von ca. 0,25 g/kg KG.

2.4 Organentnahme

Wegen der besseren Darstellbarkeit der Enzymausfälle bei nüchternen Tieren ließen wir die Versuchstiere 12 Stunden vor Organentnahme fasten. Nach leichter Äthernarkose und Gewichtsbestimmung wurden sie durch Nackenschlag getötet und nach Durchtrennung der Halsgefäße entblutet. Anschließend wurden die Lebern vollständig extirpiert, abgespült und zur Feststellung des relativen Lebergewichts gewogen. Der rechte große Leberlappen wurden abgetrennt und eingefroren. Zu Beginn benutzten wir hierzu Isopentan, das durch flüssigen Stickstoff auf -80°C gekühlt wurde. Da die Lebern bei dieser Konservierungsmethode leicht

brüchig wurden, verlegten wir uns später darauf, sie mit Hilfe der Schnellfriereinrichtung Frigocut 2700 der Firma Jung bei -40°C einzufrieren.
Lunge, Magen und Nieren wurden makroskopisch auf Veränderungen untersucht. Pathologische Befunde fanden sich hierbei nicht.
Die Lebern wurden bei einer Temperatur von -15°C mit dem Frigocut in 6-10 µ dicke Schnitte geschnitten. Im Abstand von mindestens 200 µ, fertigten wir so viele Schnitte an, daß die Gesamtschnittfläche mindestens 15 cm^2 betrug. Sofern zwei Enzymfärbungen durchgeführt wurden, stellten wir Serienschnitte her. Die Schnitte wurden auf zimmerwarme Objektträger aufgebracht und an der Luft getrocknet. Bis zur Färbung wurden sie bei -28°C im Kühlschrank gelagert.

2.5 Enzymhistochemische Darstellungen

2.5.1 ATPase-Nachweis durch die Bleisalzmethode nach Wachstein und Meisel (1960)

Bei einem PH-Optimum von 7,2 und nach Aktivierung durch Mg^{2+}-Ionen spaltet die ATPase ATP enzymatisch in ADP und Phosphat. Dieses Phosphat fällt mit Blei-Ionen als Pyromorphit $Pb_5(PO_4)_3$ aus (Pratt 1954). Durch Umfällen mit Ammonium-Sulfid wird das Pyromorphit anschließend in gut sichtbares, schwarzes und unlösliches Blei-Sulfid überführt.

Praktisches Vorgehen:

Vorfixieren in 0,5%igem Glutaraldehyd	5 sec
Wässern in fließendem Wasser	1 min
Inkubation bei 37°C (Lösung s.u.)	50-60 min
Spülen in Leitungswasser	5 sec

Fällung in 0,75%igem Ammoniumsulfid bis zur deutlichen Braunfärbung des Schnitts	1-1,5 min
Spülen in Leitungswasser	5 sec
Fixieren in 5%igem Glutaraldehyd mit Zusatz von 5%igem Eisessig	15 min
Wässern in fließendem Wasser	5 min
Kernfärbung mit Mayer's Hämalaun	30 sec
Bläuen in fließendem Wasser	15 min
Alkoholreihe 50%, 70%, 96%, 2x100%	je 1/2-1 min
2 x Xylol	je 1 min
Eindecken in Entellan^{R}	

Inkubationslösung:

- 60 ml 0,2 m Trismaleatpuffer PH 7,2 (mit 1n NaOH eingestellt)
- 65 ml Aqua dest.
- 10 ml 2% Bleinitrat
- 15 ml 0,1 m Magnesium-Sulfat
- 75 mg Adenosin-Triphosphat

Die Lösung wird auf 37^{o}C angewärmt.

2.5.2 γ-Glutamyl-Transpeptidase nach Lojda (1976)

Dieses Enzym katalysiert die Übertragung des Glutamyl-Rests von γ-Glutamyl-Peptiden auf verschiedene andere Peptide (z.B. Glycyl-Glycin). Seine Spezifität bezieht sich auf den γ-Glutamyl-Rest; der Peptid-Rest hat keine Bedeutung.
Bei der hier gewählten enzymatischen Darstellung wird γ-L-Glutamyl-Naphtylamid hydrolysiert und γ-L-Glutaminsäure auf Glycyl-Glycin übertragen. Das freiwerdende

Naphtylamin verbindet sich in einer Azo-Reaktion mit dem Diazonium-Salz p-Rosalin zu einem wasserunlöslichen Azo-Farbstoff, der als Indikator für das Enzym dient.

Praktisches Vorgehen:

Inkubation (Lösung s.u.)	20 min
Spülen in Aqua dest.	ca. 5 sec
2% Kupfersulfat	5 min
Spülen in Aqua dest.	ca. 5 sec
4% Formaldehyd	mehrere Stunden
Spülen in Aqua dest.	
Eindecken in Glycerin-Gelatine	

Inkubationsmedium:

1. 0,25 ml p-Rosalin HCl
   + 0,25 ml $NaNO_2$
   + 8,5 ml 0,1 m Na-Acetat
   mischen, mit NaOH oder Essigsäure auf PH 6,4 einstellen.

2. 1 ml Substratlösung (s.u.)

3. 5 mg Glycyl-Glycin

Substratlösung:

12 mg γ-L-Glutamyl-Naphtylamid
+ 0,15 ml NN-Dimethyl-Formamid
+ 0,15 ml 1 n NaOH
mischen bis gelöst, dann 4,7 ml Aqua dest. hinzugeben

p-Rosalin: 400 mg basisches Fuchsin
8 ml Aqua dest.
2 ml 36% HCl

mischen und filtrieren.

2.6 Ausmessen der Schnitte

Als Inseln wurden alle Areale gewertet, die aus mindestens 3 Zellen mit negativer ATPase bzw. positiver γ-GT bestanden, und außerdem entweder deutlich von ihrer Umgebung abgegrenzt waren oder eine von der Umgebung abweichende Zellstruktur zeigten. Diese Gebiete wurden auf zwei Methoden ausgewertet, wobei eine Mindestschnittfläche pro Tier von 6 cm^2 ausgemessen wurde.

2.6.1 Integrationsplatte

Nach 102,5facher Vergrößerung durch ein Zeiss-Mikroskop wurde das Präparat auf die Integrationsmattscheibe projiziert (Integrationsplatte II 100/25 von Zeiss).

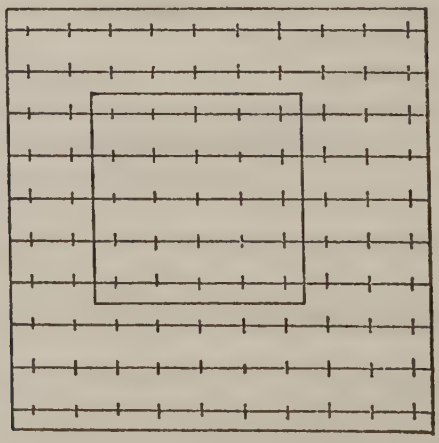


Abb. 3: Zeiss-Integrationsplatte II 100/25

Aus dieser Vergrößerung ergab sich, daß ein Strichabstand auf der Projektionsplatte 93 µm auf dem Präparat entsprach - ein Gesichtsfeld repräsentierte also 0,93 x 0,93 mm^2 =

0,86 mm^2 auf dem Präparat. Mäanderförmig wurde das ganze Präparat abgefahren, dabei wurden mit drei manuellen Zählgeräten die Anzahl der Gesichtsfelder (Z), die Zahl der angetroffenen Inseln (I) und außerdem alle auf Inseln fallende Strichmarkierungen (S) gezählt. Entsprechend der Auswertung von Blutbildern wurden von den Inseln, die auf die Randmarkierungen fielen, nur diejenigen berücksichtigt, die rechts oder oben randständig waren.
Aus diesen Werten läßt sich die durchschnittliche Anzahl der Inseln pro Meßfeld als Quotient I/Z bestimmen, aus dem Quotienten S/Z erhält man den Anteil der Inselfläche am Gesamtgewebe in Prozent, und S/I ergibt die mittlere Größe der Einzelinsel. Um die absoluten Werte in mm^2 zu erhalten, werden die auf ein Meßfeld von 0,86 mm^2 bezogenen Größen umgerechnet.

2.6.2 Manuell optischer Bildanalysator (MOP)

Mit Hilfe des Neo-Promar-Projektionsmikroskops der Firma Ernst Leitz, Wetzlar, wurde ein 132,5fach vergrößerter Ausschnitt des Präparats auf eine Gitterplatte projiziert. Der ausgemessene Bereich wurde so gewählt, daß er auf dem Präparat einer Fläche von 1,5 x 1,5 mm^2 = 2,25 mm^2 entsprach. Analog zur Integrationsplatte wurde das Präparat begutachtet - die Auswertung erfolgte hier allerdings mit Hilfe des manuell optischen Bildanalysators der Firma Kontron, Eching bei München.
Das MOP-System besteht aus einer elektronischen Zähl- und Speichereinheit, einer Gitterplatte und einem Druck-Stift. Mit Hilfe dieses Auswertestifts werden die enzymfreien Areale umfahren. Das Abtasten der Gitterplatte erzeugt Zählimpulse, die direkt der Speichereinheit zugeführt werden - ein Computer speichert die eingegebenen Inseln nach Fläche und Durchmesser in 49 Größenklassen. Wenn

ein Präparat ausgemessen ist, lassen sich durch den Streifendrucker Inselzahl, Gesamtfläche der ausgemessenen Inseln und die Anzahl der Inseln in jeder Größenklasse abrufen, so daß nur noch die Zahl der Meßfelder manuell gezählt werden muß. Durch Umrechnen der ausgedruckten Werte auf die gesamte ausgemessene Fläche des Präparats erhält man die tabellarischen Werte.
Der große Vorteil dieser Auswertemethode liegt darin, daß ich hier neben prozentualer Inselfläche, Inselzahl/mm^2 und mittlerer Größe der Einzelinsel auch die Größenverteilung der Inseln erhalte. Dies ist besonders bei der Berechnung der Anzahl der Inseln bezogen auf die Volumeneinheit von Bedeutung.

2.7 Auswertverfahren

Die histologischen Präparate liefern nur einen zweidimensionalen Ausschnitt aus dem Lebergewebe. Zur Beurteilung des tatsächlichen Ausmaßes des Tumorbefalls ist es also nötig, sie auf die Volumeneinheit umzurechnen.
Nach den stereologischen Gesetzen wird die Wahrscheinlichkeit, daß eine Struktur durch einen Gewebsschnitt angetroffen wird, umso größer, je größer diese Struktur ist. Mit zunemender Größe der Einzelinsel nimmt also die gemessene Inselzahl überproportional zu.
Eine Möglichkeit, diesen Fehler auszuschalten, besteht darin, die gemessene Inselzahl/cm^2 (I) in Abhängigkeit von der Inselfläche (A) durch folgende Näherungsformel zu korrigieren:

Inselzahl/cm^3 = N: (Weibel et al., 1962)

$$N = \frac{I^{3/2}}{1{,}382 \times A^{1/2}}$$

Genauere Werte erhält man, wenn man die Verteilung der Inselflächen in Größenklassen berücksichtigt. Da bei der Messung einer großen Insel periphere Kugelschnitte getroffen werden, die das Vorhandensein einer kleinen Insel vortäuschen, entwickelte Scherer (1972) ein kompliziertes Auswertverfahren, das diesen Fehler ausgleicht. Hierzu werden die Inseln in Größenklassen eingeteilt, deren Größenabstände jeweils Verdoppelungssprünge darstellen - die durch den MOP gemessenen 49 Klassen werden also zu 11 Klassen zusammengefaßt. Durch das von Scherer entwickelte Computerprogramm wird dann für jede Inselgröße die Anzahl von peripheren Kugelschnitten errechnet, die erwartungsgemäß zu viel gezählt werden, und von der entsprechenden kleineren Größenklasse subtrahiert. Für den Fall, daß man bei dieser Berechnung für eine Größenklasse einen negativen Wert erhält, nimmt man an, daß diese Klasse leer ist - die negative Zahl quasi die Inseln umfaßt, die wegen technischer Unzulänglichkeiten nicht gewählt worden sind. Dies tritt vor allem bei sehr kleinen Inseln auf und ist verständlich angesichts der Tatsache, daß überhaupt erst Inseln ab einer Größe von mindestens 3 Zellen gezählt wurden und daß sehr kleine Inseln sehr leicht mit Glykogen-Speicher-Zellen verwechselt werden.
Zur Berechnung der Verteilungen wurden die Tiere einer Versuchsgruppe zusammengefaßt, sofern für jedes Tier die gleiche Schnittfläche ausgewertet worden war. Ansonsten wurden die Verteilungen der Einzeltiere berechnet und anschließend das arithmetische Mittel gebildet. Dieses Vorgehen liefert mir für jede Versuchsgruppe die Verteilung der Inselgrößen in der Volumeneinheit.

3. ERGEBNISSE

Um den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Entstehung und das Wachstum enzymfreier Areale beurteilen zu können, ist die Kenntnis der Wachstumskinetik dieser Inseln bei Dauerapplikation eines Carcinogens und nach dessen Absetzen erforderlich.
Wenn man den Versuchstieren das Carcinogen kontinuierlich zuführt, so steigen Inselzahl, Inselfläche und Größe der Einzelinsel während der Applikationszeit gleichmäßig an. Im Fall von DÄNA ergibt sich dabei in doppelt logarithmischer Darstellung eine Gerade mit einer Steigung von etwa 70° für die Inselzahl, 78° für die Inselfläche und $50\text{-}60^{\circ}$ für die mittlere Größe der Einzelinsel (Stöckle 1979).
Eine ähnliche Wachstumskinetik erhält man bei Applikation eines weiteren Carcinogens im Anschluß an die DÄNA-Gabe. Inselzahl, Inselfläche und mittlere Inselgröße wachsen dann mit der für das zweite Carcinogen charakteristischen Steigung weiter.
Nach Absetzen des Carcinogens ergibt sich ein anderes Bild. Aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe ergab sich, daß in diesem Fall die Inselzahl nach Sistieren der Carcinogenzufuhr noch eine Zeitlang ansteigt, nach Erreichen eines Maximums wieder etwas abfällt, bis schließlich ein Gleichgewichtszustand entsteht, in dem die Zahl der Inseln konstant bleibt.
Auch nach Erreichen dieses Gleichgewichtszustands nehmen aber die Einzelinseln an Größe zu - genau wie beim Durchfüttern mit der Steigung 45° - daraus resultierend wächst die prozentuale Inselfläche mit dieser gleichen Steigung weiter.

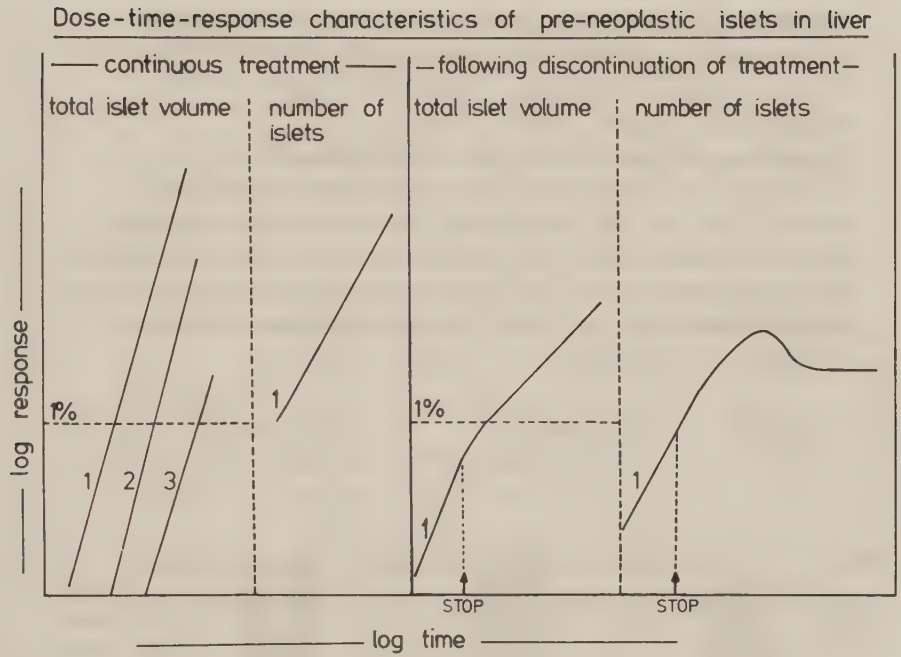


Abb. 4: Dosis-Wirkungs-Charakteristiken präneoplastischer Inseln in der Leber

3.1 Vergleich der Wirkung von Phenobarbital auf das Inselwachstum mit der Wirkung anderer lebervergrößernder Substanzen

4 Wochen lang mit 6 mg DÄNA vorbehandelte Tiere wurden mit Phenobarbital, Clofibrat und Trifluoressigsäure (TFA), einem Abbauprodukt von Halothan, nachbehandelt. Als Kontrolle dienten Tiere, die nach der Initiation durch DÄNA Wasser erhalten hatten. 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Absetzen des Carcinogens wurden 5 Tiere aus jeder Gruppe untersucht. Clofibrat und TFA wurden deswegen verwandt, weil sie im Gegensatz zu Phenobarbital ihre leberver-

größernde Wirkung nicht aufgrund einer Induktion des Cytochrom P_{450}-abhängigen mikrosomalen Enzymsystems bewirken, sondern durch eine Induktion mitochondrialer Enzyme (Kunz et al., 1966, 1969).
Dieser Versuch sollte klären, ob die Inseln der mit Phenobarbital behandelten Tiere eine Wachstumskinetik zeigen, wie sie bei Gabe eines Carcinogens zu erwarten wäre. Außerdem sollte der Vergleich mit anderen Substanzen die Frage beantworten, ob die Induktion unterschiedlicher Enzymsysteme auch in einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten resultiert.

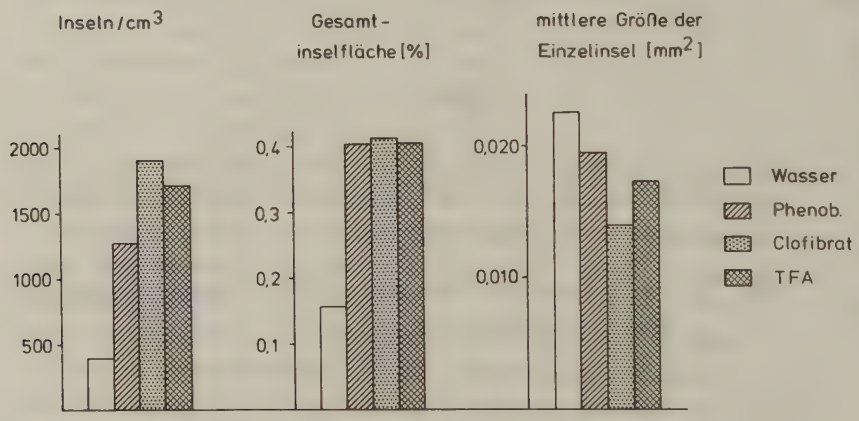


Abb. 5: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschließend sechswöchige Applikation von Clofibrat, TFA, Phenobarbital bzw. Wasser.

Nach 6 Wochen war die Inselzahl der Tiere, die mit lebervergrößernden Substanzen nachbehandelt worden waren, um den Faktor 4 gegenüber der Kontrolle erhöht. Gleichzeitig war die prozentuale Inselfläche bei den nachbehandelten Tieren doppelt so groß wie bei den Kontrolltieren - die Einzelinseln also im Schnitt kleiner. (s. Abb. 5 und Tab. 1)

Tabelle 1: Vergleich von prozentualer Inselfläche A, Inselzahl I pro cm^2, mittlerer Inselfläche M und Inselzahl I pro cm^3. Für A und I/cm^3 ist außerdem die Wirkungssteigerung durch Fremdstoffe angegeben, bezogen auf Wasser = 100.

	A (%)	%	I/cm^2	M	I/cm^3	%
H_2O	0,158	100	6,3	22,5	384	100
Clofibrat	0,413	261	26,9	13,88	1897	494
TFA	0,405	256	24,3	17,17	1714	446
Phenob.	0,403	255	18,8	19,39	1267	330

Vorbehandlung: 4 Wochen DÄNA im Trinkwasser
Nachbehandlung: 6 Wochen Clofibrat, TFA und Phenobarbital

Betrachtet man die Größenverteilungen der Inseln, so zeigt sich, daß bei den nachbehandelten Tieren alle Inselklassen gegenüber der Kontrolle erhöht sind. Die Form der Verteilung ist sehr ähnlich wie bei den Kontrolltieren, abgesehen von einer leichten Verschiebung in die kleineren Klassen (s. Abb. 6).
Die Gabe lebervergrößernder Substanzen bewirkt also nach 6 Wochen das Auftreten von mehr, vor allem kleinen Inseln.

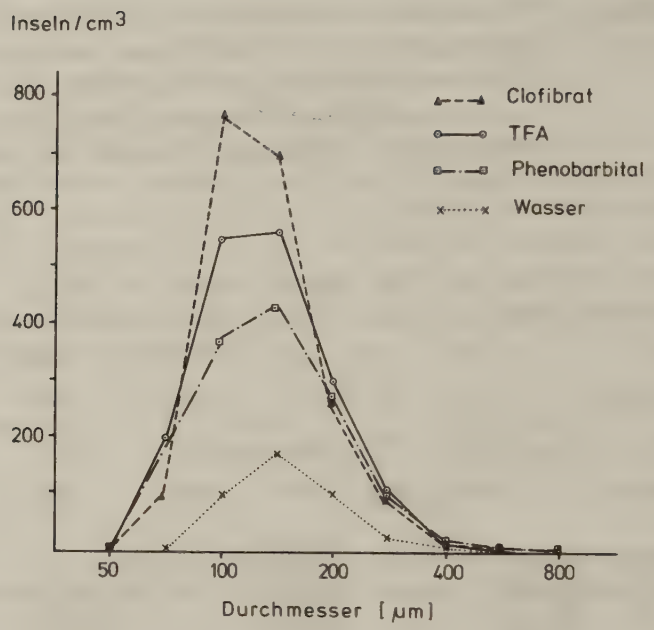
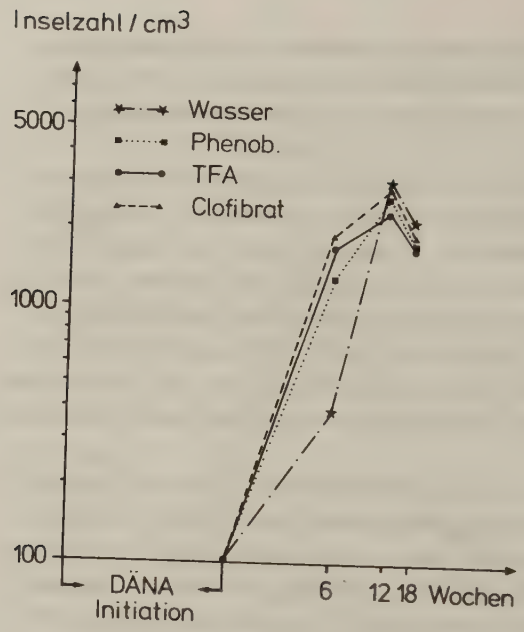


Abb. 6: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschließend sechswöchige Applikation von Clofibrat TFA, Phenobarbital bzw. Wasser. Verteilung der Inselgrößen.

Dieses Ergebnis scheint auf eine eigencarcinogene Wirkung der lebervergrößernden Substanzen hinzudeuten, denn nach der oben beschriebenen Wachstumskinetik erhält man ja bei der Anschlußbehandlung mit einem zweiten Carcinogen neue kleine Inseln, während bei der Nachbehandlung mit einem Promotor kaum eine Steigerung der Inselzahl zu erwarten gewesen wäre. Vielmehr hätte man hier mit einem schnelleren Wachstum der Einzelinsel gerechnet.

Den Eindruck einer eigencarcinogenen Wirkung der lebervergrößernden Substanzen muß man revidieren, wenn man die Inselzahl zu einem späteren Zeitpunkt betrachtet (s. Abb. 7).
Nach 12 und 18 Wochen hat sich der Anstieg der Inselzahl bei den nachbehandelten Tieren gegenüber der Kontrolle nicht weiter fortgesetzt. Vielmehr liegt zu diesem Zeitpunkt die Inselzahl bei allen Tieren im gleichen Bereich. Nach Erreichen eines Maximums gehen die Inselzahlen der mit Phenobarbital, Clofibrat oder TFA behandelten Tiere genauso zurück wie bei der Kontrolle. Bei der Gabe eines Carcinogens dagegen wäre die Inselzahl weiterhin kontinuierlich gestiegen.
Vergleicht man die Größenverteilungen zu einem späteren Zeitpunkt, so verlaufen sie nahezu identisch, bei den nachbehandelten Tieren zeigt sich eine leichte relative Verschiebung in die größeren Klassen (s.tabell. Anhang). Dies zeigt sich noch deutlicher bei der Betrachtung der mittleren Inselgröße. Während nach 6 Wochen die Inseln der nachbehandelten Tiere durchweg kleiner als die der Kontrolltiere gewesen waren, hat sich dieses Bild nach 18 Wochen umgekehrt. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Inseln erheblich schneller gewachsen als bei der Kontrolle und übertreffen sie an Größe erheblich (s. Abb. 8).

Die mittlere Inselgröße wird durch das Wachstum der einzelnen Inseln bestimmt - gleichzeitig gehen in ihre Berechnung aber auch die neu auftretenden kleineren Inseln ein. Solange also neue kleinere Inseln entstehen, wächst die mittlere Inselgröße nur unmerklich.
Man hat daher den Eindruck, daß bei den Kontrolltieren noch bis zur 18. Woche neue Inseln entstehen, zu einem Zeitpunkt, zu dem die ersten Inseln bereits wieder absterben. Bei den nachbehandelten Tieren scheinen alle initiierten



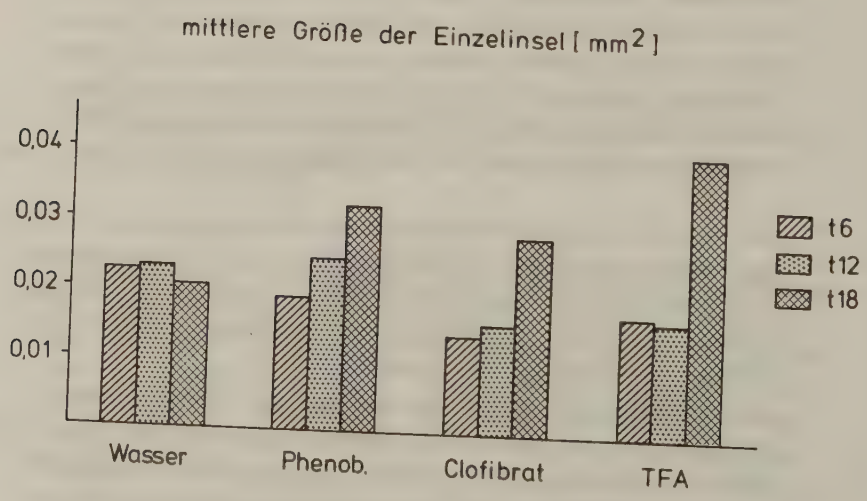


Abb. 7 u. 8: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschl. Clofibrat, TFA, Phenobarb. bzw. Wasser. Untersuchung: 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA-Behandlg. Wachstumsverlauf von Inselzahl und mittlerer Inselfläche.

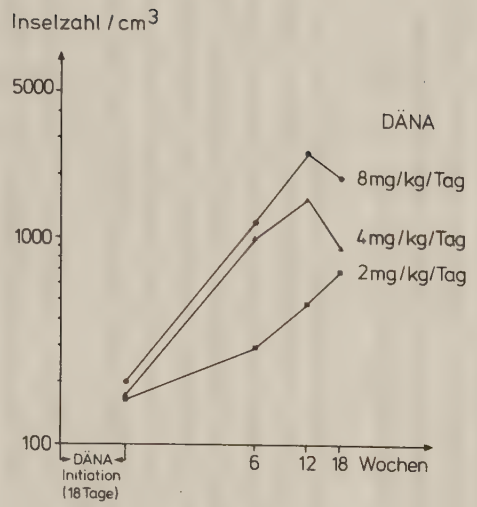
Zellen bereits nach 12 Wochen realisiert zu sein - es entstehen keine neue Inseln mehr. Dies legt den Eindruck nahe, daß die Wirkung der lebervergrößernden Substanzen auf einer Beschleunigung des Zeitablaufs beruht. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, daß der Wachstumsverlauf der nachbehandelten Tiere eine ähnliche Form hat wie der der Kontrolle, anfänglich jedoch die Inselzahl deutlich erhöht ist und das Maximum früher erreicht wird.
Es ist nicht erkennbar, daß Clofibrat und TFA einen prinzipiell anderen Einfluß auf das Inselwachstum ausüben als Phenobarbital
Dieser Versuch zeigt, daß es nicht ausreicht, die Wirkung eines Pharmakons auf die Inselentstehung zu einem einzigen Zeitpunkt zu betrachten. Der Einfluß auf das Wachstumsverhalten kann nur über einen längeren Zeitraum hinweg sinnvoll beurteilt werden.
Um die Hypothese zu bestätigen, daß die Wirkung von Phenobarbital auf einer Beschleunigung des Zeitablaufs beruht, muß ich die verschiedenen Einflüsse kennen, die die Wachstumskinetik der Inseln modifizieren können. Deshalb ist es nötig, der Frage nachzugehen, inwieweit sich eine Veränderung der Carcinogen-Dosis oder der Phenobarbital-Dosis auf den Verlauf des Inselwachstums auswirkt.

3.2. Der zeitliche Ablauf des Inselwachstums in Abhängigkeit von der Carcinogen-Dosis

18 Tage lang mit 2, 4 oder 8 mg DÄNA vorbehandelte Tiere wurden 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der Carcinogen-Applikation miteinander verglichen. Die Hälfte der Tiere erhielt im Anschluß an die DÄNA-Behandlung Phenobarbital, die Kontrolle Wasser.

3.2.1 Inselentwicklung ohne Phenobarbital-Einwirkung

Für die Inseln der Tiere, die nach der Initiation Wasser erhalten hatten, ergab sich der in Abb. 9 dargestellte Wachstumsverlauf.
Bei den Tieren, die nur 2 mg DÄNA erhalten hatten, steigt die Inselzahl während der gesamten Beobachtungszeit langsam an. Mit Erhöhung der Carcinogen-Dosis wird der Anstieg steiler - bei den höheren Dosierungen wird das Maximum der Inselzahl bereits innerhalb von 18 Wochen erreicht, und die Inselzahl fällt am Ende wieder etwas ab. Je höher also die Carcinogen-Dosis ist, desto höher liegt die maximale Inselzahl und desto früher wird dies Maximum erreicht. Betrachtet man die prozentuale Inselfläche, so wächst diese für alle Dosierungen kontinuierlich an (s. Abb. 9b). Selbst zu dem Zeitpunkt, wo die Inselzahl abnimmt, steigt sie weiter, da die einzelnen Inseln wachsen, die mittlere Inselgröße also zunimmt (s. Tab. 2).



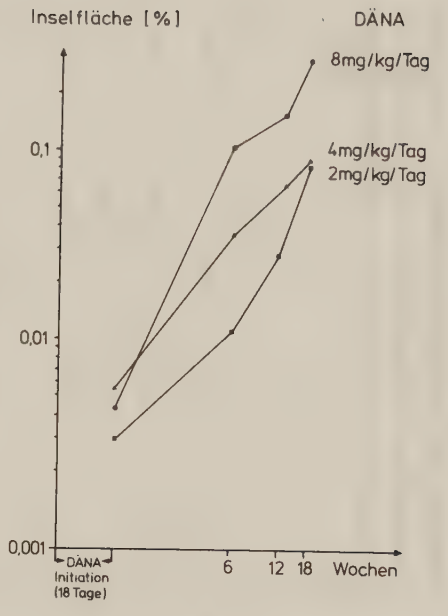


Abb. 9a/b: Achtzehntägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG, anschließend Wasser. Untersuchungstermine: 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Behandlung.

Tabelle 2: Achtzehntägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG, anschließend Wasser. Vergleich der mittleren Inselgrößen O, 6, 12 und 18 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Behandlung.

	t_o	t_6	t_{12}	t_{18}
2 mg	2,5	6,1	7,8	11,2
4 mg	3,8	4,8	5,2	9,4
8 mg	3,2	8,9	6,6	12,9

Die mittlere Größe der Einzelinsel liegt unabhängig von der Carcinogen-Dosierung in der gleichen Größenordnung - sie wächst jedoch im Laufe der Zeit an.
Ein genaueres Bild über das Wachstumsverhalten der Inseln erhält man, wenn man ihre Größenverteilung zu den verschiedenen Zeitpunkten betrachtet (s. Abb. 10 und 11).

Beim Vergleich der Größenverteilungen fällt auf, daß sie unabhängig von der Carcinogen-Dosierung nach 6 und 12 Wochen annähernd die gleiche Form haben - das heißt, eine Erhöhung der Carcinogen-Dosis bewirkt in allen Klassen eine gleichmäßige Erhöhung der Inselzahl. Innerhalb er ersten 12 Wochen hat also weder die Carcinogen-Dosis noch die Zeit einen eindeutigen Einfluß auf die Verteilungsform.
Ein anderes Bild ergibt sich nach 18 Wochen. Während die Inseln der mit 2 mg initiierten Tiere weiterhin die gleiche Verteilungsform behalten, ist die Verteilung der 4 mg- und 8 mg-Tiere in die größeren Klassen verschoben. Diese Verschiebung fällt mit dem Abfall der Gesamtinselzahl zusammen - aus der Verteilung ist ersichtlich, daß der Abfall vor allem die kleinen und mittelgroßen Inseln betrifft.

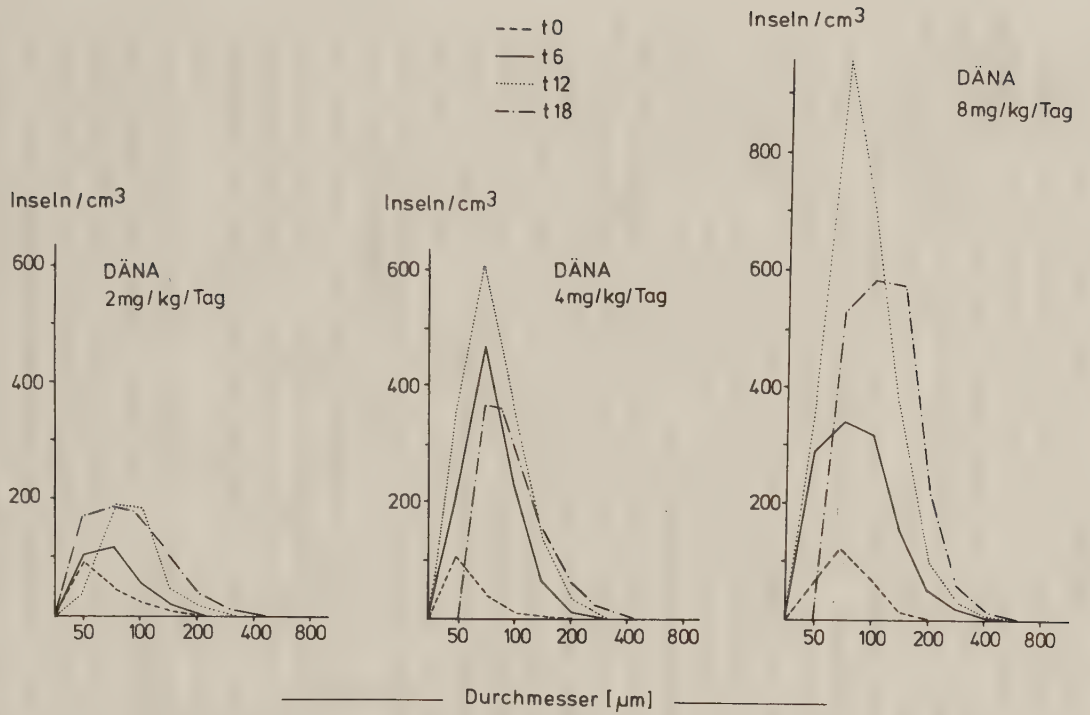


Abb. 10: Achtzehntägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG, anschließend Wasser. Verteilungen der Inselgrößen o, 6, 12 und 18 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Behandlung.

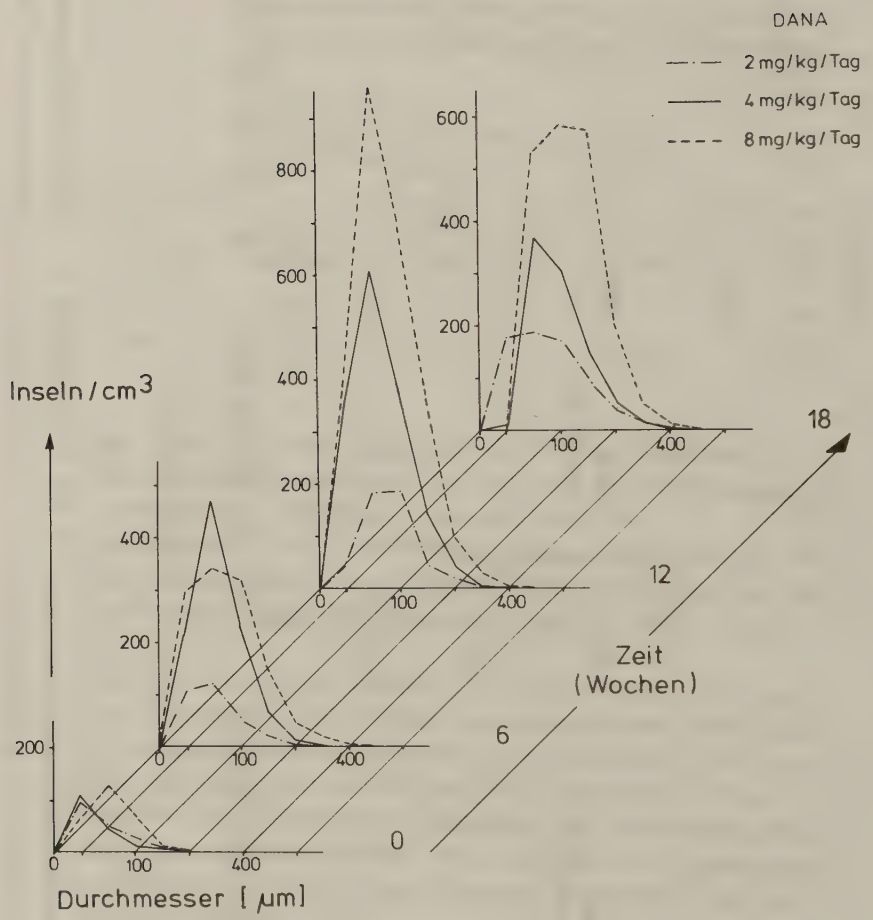


Abb. 11: Achtzehntägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG, anschließend Wasser. Verteilungen der Inselgrößen 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Beendigung der DÄNA-Behandlung.

Dieses Ergebnis erlaubt folgenden Schluß: Vom Zeitpunkt der Initiation durch DÄNA bis zur Manifestation als enzymdefekte Insel benötigt die Zelle eine gewisse Zeit (Latenzzeit). Nach 6 Wochen sind deshalb noch nicht alle transformierten Zellen als Inseln erkennbar, laufend entstehen neue kleine Inseln. Aus der Tatsache, daß bei einer Dosierung von 4 und 8 mg nach 18 Wochen keinerlei kleine Inseln mehr existieren und auch im mittleren Größenbereich weniger Inseln vorhanden sind, kann man schließen, daß zu diesem Zeitpunkt keine neuen Inseln mehr auftreten. Das heißt also, daß in diesem Dosisbereich nach ca. 12 Wochen alle Inseln manifest geworden sind. Von jetzt ab wird die prozentuale Inselfläche nur noch durch das Wachstum der Einzelinsel vergrößert. Da gleichzeitig enzymdefekte Zellen, die nicht maligne transformiert sind, nach ihrer Lebensdauer absterben, nimmt die Inselzahl von t_{12} nach t_{18} sogar wieder leicht ab. Die verbleibenden Inseln unterliegen deswegen nicht dem physiologischen Zelluntergang, da aufgrund schnellerer Zellteilungen die Zellneubildung den Zelltod überwiegt. Dieser Befund deckt sich mit den Untersuchungen von Rabes, der ab dem 90. Tag für einen Teil der enzymdefizienten Inseln eine erhöhte Proliferationsrate fand (Rabes, 1972).
Bei den Tieren, die nur 2 mg DÄNA erhalten haben, kommen noch bis zur 18. Woche kleine Inseln neu hinzu, die Inselzahl erreicht ihr Maximum später, die Latenzzeit zwischen Initiation und Manifestation dauert also länger.
Dieses unterschiedliche Wachstumsverhalten für kleinere und größere DÄNA-Dosierungen läßt sich dadurch erklären, daß DÄNA neben seiner mutagenen Wirkung einen unspezifischen Wachstumsstimulus auf die Leberzellen ausübt. Diese konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsrate von Hepatozyten durch DÄNA wurde auch von Rajewsky beschrieben (1972).

3.2.2 Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung nach diskontinuierlicher DÄNA-Applikation

Ausgehend von der Annahme, daß der Prozeß der Initiation irreversibel und kumulativ summierbar ist, postulierte Rajewsky (1966), daß auch nach diskontinuierlicher Carcinogen-Gabe die Formel $d \times t^n = \text{const.}$ gelten müsse. In der Tat entstanden bei seinen Versuchen auch nach Absetzen des Carcinogens gehäuft Tumoren, die jedoch später als bei den durchgefütterten Tieren auftraten. Zur Untersuchung der Gültigkeit der Formel $d \times t^n = \text{const.}$ bei diskontinuierlicher DÄNA-Applikation ging er weiter von der Modellvorstellung aus, daß anstelle der kurzzeitigen Carcinogengabe und anschließenden Latenz die applizierte Carcinogen-Dosis über den gesamten Zeitraum bis zum Tumortod appliziert worden sei.
Die effektive tägliche Carcinogen-Dosis errechnet sich somit aus der tatsächlich kurzfristig gegebenen Carcinogen-Menge nach der Formel:

$$d = \frac{\text{Gesamte aufgenommene Carcinogen-Menge}}{\text{Zeit bis zum Tumortod}}$$

$$= \frac{\text{Täglich applizierte Dosis x Applikationszeit}}{\text{Zeit bis zum Tumortod}}$$

In seinen Versuchen konnte Rajewsky nun zeigen, daß kein grundsätzlicher Unterschied zwischen kontinuierlicher und diskontinuierlicher Carcinogen-Gabe besteht. Nach oben beschriebener Umrechnung der Dosis erhielt er in beiden Fällen in der Formel $d \times t^n = \text{const.}$ für n einen Wert von ca. 2,3.

Um zu untersuchen, ob diese Gesetzmäßigkeit auch für das Wachstum präcanzeröser ATPase-negativer Inseln gilt, wurden mit Hilfe von Abb. 9b für die 3 verschiedenen DÄNA-Dosierungen die Zeiten nach Beginn der Carcinogen-Applikation graphisch ermittelt, die zum Erreichen von 0,02% und 0,05% Inselfläche erforderlich sind.

	2 mg	4 mg	8 mg
0,02 %	11,5 Wochen = 80,5 Tg.	5,4 Wochen = 37,8 Tg.	3,9 Wochen = 27,3 Tg.
0,05 %	17 Wochen = 119 Tg.	11,8 Wochen = 82,6 Tg.	5,8 Wochen = 39,2 Tg.

Umgerechnet auf den gesamten Beobachtungszeitraum ergaben sich hieraus folgende Dosierungen d:

Für 0,02 %: $\frac{2 \times 18}{80,5}$ = 0,45 g entspr. 80,5 Tg.

$\frac{4 \times 18}{37,8}$ = 1,9 g entspr. 37,8 Tg.

$\frac{8 \times 18}{27,3}$ = 5,3 g entspr. 27,3 Tg.

Entsprechend für 0,05 % : 0,3 g entspr. 119,0 Tg.
0,87 g entspr. 82,6 Tg.
3,7 g entspr. 39,2 Tg.

Trägt man diese Dosierungen in Abhängigkeit von der erforderlichen Zeit im doppelt logarithmischen Netz auf, so erhält man sowohl für 0,02% als auch für 0,05% Inselfläche eine Gerade mit der von Druckrey für die Tumormanifestation gefundenen Steigung von 2,3 (s. Abb. 12).

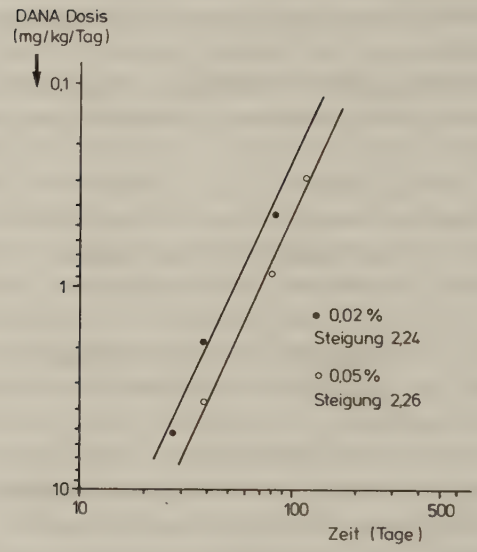
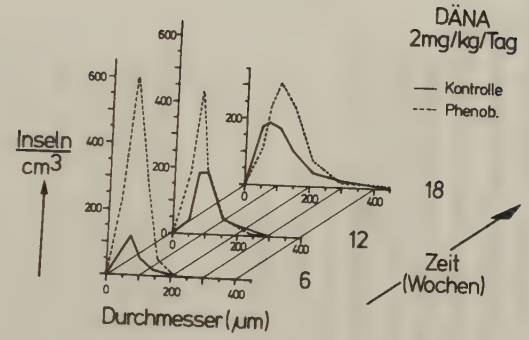


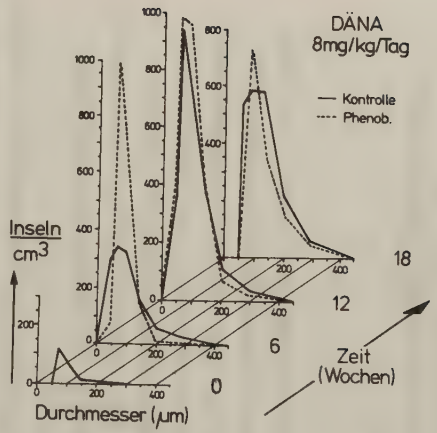
Abb. 12: Achtzehntägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG, anschließend Wasser. Beziehung zwischen der Zeit bis zum Auftreten von 0,02 bzw. 0,05% Inselfläche und der auf den Beobachtungszeitraum umgerechneten Dosis.

Dieses Ergebnis spricht für die Gültigkeit der Druckrey'schen Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung für das Wachstum präcancerö-ser Inseln auch nach diskontinuierlicher Carcinogen-Appli-kation.

3.2.3 Einfluß von Phenobarbital-Nachbehandlung auf den Zeit-Wirkungsverlauf des Inselwachstums nach Initiierung mit variabeler Carcinogen-Dosis

Im Anschluß an die Initiation durch 2, 4 oder 8 mg DÄNA erhielten die Versuchstiere Phenobarbital in einer Dosierung von 100 mg/kg KG. Aus dem Vergleich der Größenverteilungen ist wiederum ersichtlich, daß Phenobarbital nur zu Beginn der Nachbehandlung eine deutliche Steigerung der Inselzahl hervorruft. Später beruht seine Wirkung hauptsächlich darauf, daß die einzelnen Inseln schneller wachsen (s. Abb. 13).
Daß die Wirkung von Phenobarbital vor allem darin besteht, den Zeitablauf zu beschleunigen, zeigt sich auch daran, daß seine Applikation nur bei den Tieren die Inselzahl erhöht, die mit 2 mg DÄNA vorbehandelt waren, deren Kontrolle also nach 18 Wochen die maximale Inselzahl noch nicht erreicht hatte. Bei den 8 mg-Tieren dagegen, bei denen zu diesem Zeitpunkt schon alle initiierten Inseln realisiert waren, bewirkt Phenobarbital eine Reduktion der Inselzahl (s. Abb. 14).
Die Gesamt-Inselfläche hingegen ist auch nach 18 Wochen durchweg erhöht (s. Abb. 15).





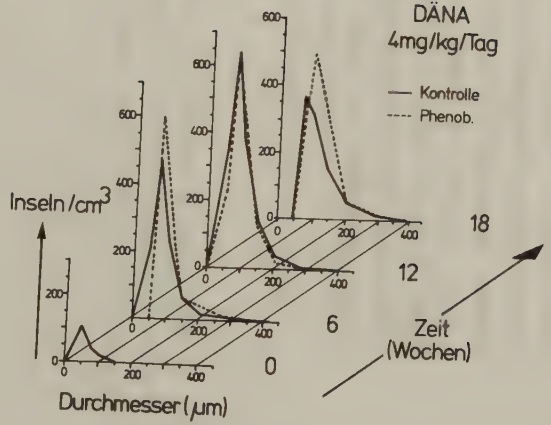
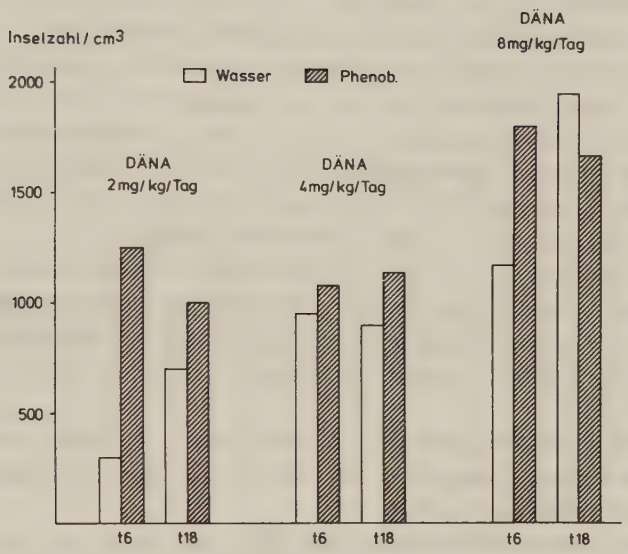


Abb. 13: Achtzehntägige Applikation von 2, 4, und 8 mg DÄNA/kg KG. Vergleich der Verteilungen der Inselgrößen bei Anschlußbehandg. mit Wasser und Phenobarbital. Untersuchung: 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA- Behandlung



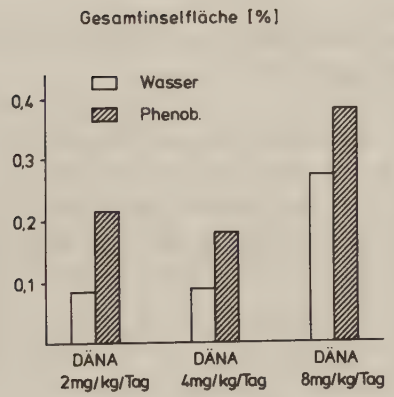


Abb. 14 u. 15: Einfluß von Phenobarbital- Nachbehandlung auf die Inselzahl 6 u. 18 Wochen nach Ende der Carcinogen- Applikation. Gesamtinselfläche 18 Wochen nach Ende der DÄNA- Zufuhr

Bemerkenswert ist außerdem, daß die Phenobarbital-Wirkung durchweg stärker bei den Tieren ausgeprägt ist, die mit kleineren DÄNA-Dosen vorbehandelt sind. Dies läßt sich wiederum mit der proliferationsanregenden Wirkung von DÄNA erklären: Zellen, deren Wachstumsrate bereits durch hohe DÄNA-Dosen stimuliert wird, können darüber hinaus durch Phenobarbital nicht mehr so ausgeprägt zur Proliferation angeregt werden.
Bei den Tieren, die mit Phenobarbital nachbehandelt wurden, fällt außerdem auf, daß Sie vereinzelt riesige enzymdefekte Areale aufweisen, die bei den Kontrolltieren noch nicht beobachtet werden können (s. Abb. 16).

Diese großflächigen Areale haben schon deutlich neoplastischen Charakter, sie verdrängen das sie umgebende Gewebe. (s. Abb. 17)
Unter Phenobarbital-Einfluß wird also nicht nur die Zeit bis zum Auftreten enzymfreier Inseln verkürzt, sondern auch die Latenzzeit bis zur Manifestation der Tumoren.

3.2.4 Beeinflussung der DÄNA-Dosis-Zeit-Wirkungskurve durch Phenobarbital

Ein geeignetes Mittel zur quantitativen Erfassung der Phenobarbitalwirkung bietet der Verlauf der Dosis-Zeit-Wirkungskinetik. Die Abb. 18 a-c zeigt das Wachstum der Inselfläche in Abhängigkeit von der Zeit.

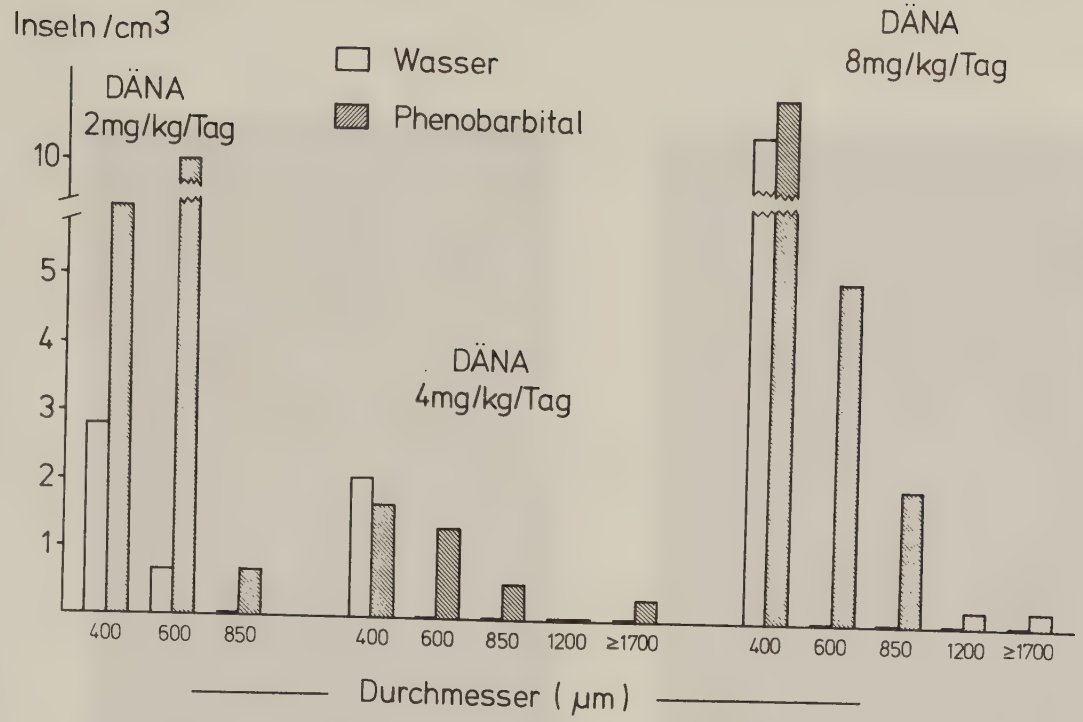


Abb. 16: Achtzehntägige Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG. Anschließend Behandlung mit Wasser bzw. Phenobarbital. Darstellung der großen Inselklassen 18 Wochen nach Ende der DÄNA-Behandlung.

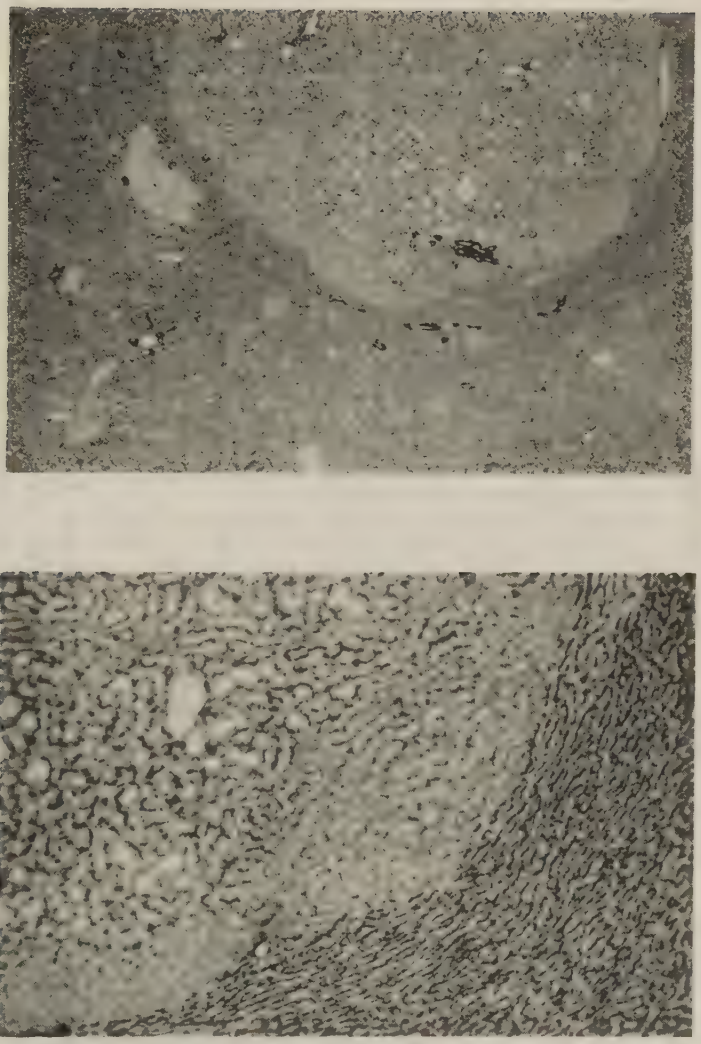
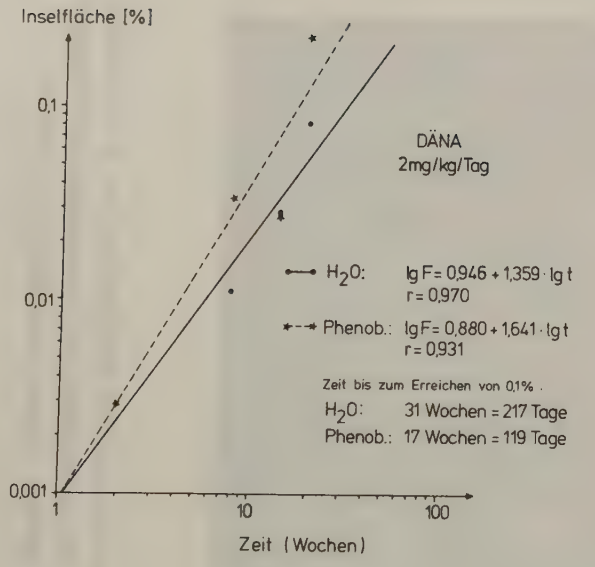


Abb. 17: Achtzehntägige Applikation von 8 mg DÄNA/kg KG
Anschlußbehandlung Phenobarbital 17 Wochen
ATPase- freier neoplastischer Knoten



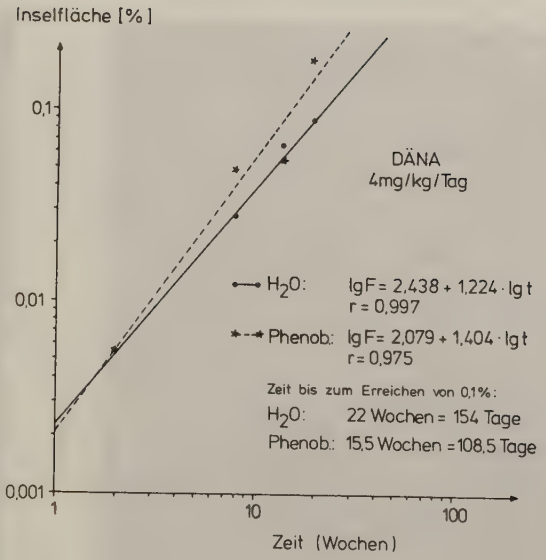


Abb. 18a und b: Achtzehntägige Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG. Anschlußbehandlung mit Wasser bzw. Phenobarbital. Untersuchungszeitpunkte 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA-Behandlung. Wachstum der Inselfläche (Regressionsgeraden).

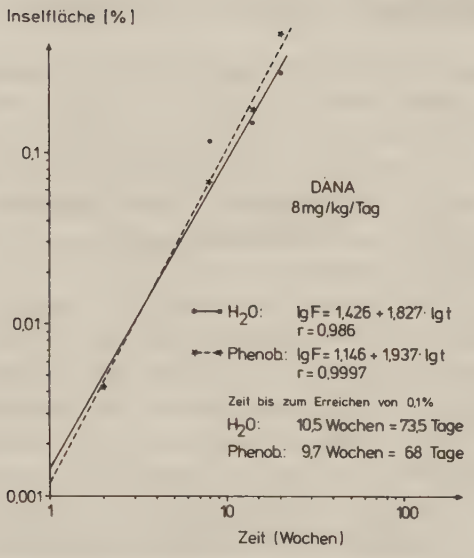


Abb. 18c: Achtzehntägige Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG. Anschlußbehandlung mit Wasser bzw. Phenobarbital. Untersuchungszeitpunkte 0, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA-Behandlung. Wachstum der Inselfläche (Regressionsgeraden).

Mit Hilfe der Regressionsgeraden wurde die Zeit bis zum Erreichen von 0,1% Inselfläche ermittelt und gegen die nach Rajewsky umgerechnete Dosis aufgetragen, so daß sich die in Abb. 19 gezeigte Dosis-Zeit-Wirkungs-Kurve ergab.

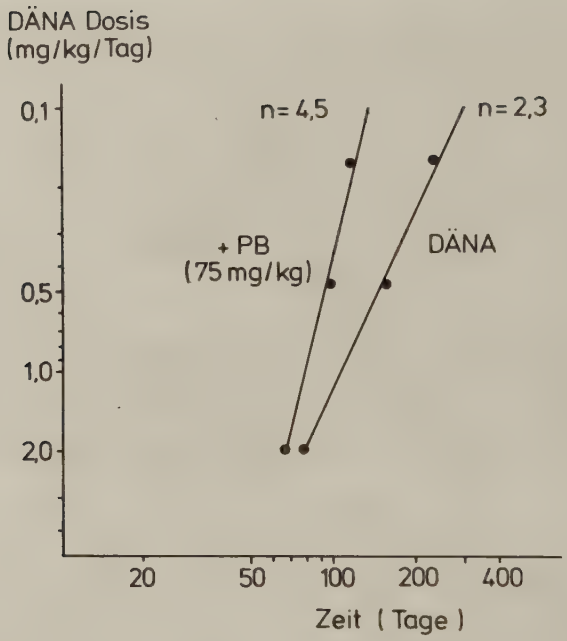


Abb. 19: Achtzehntägige Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG. Anschlußbehandlung mit Wasser bzw. Phenobarbital. Beziehung zwischen der Zeit bis zum Auftreten von 0,1% Inselfläche und der auf den Beobachtungszeitraum umgerechneten Dosis.

Wie bereits vorher besprochen, erhält man für alleinige DÄNA-Applikation eine Steigung von 2,3. Unter Phenobarbital-Einfluß nimmt die Gerade einen steileren Verlauf ein, die Nachbehandlung äußert sich also in einer Erhöhung von n. Da n ein Ausdruck für die Verstärkerwirkung der Zeit ist, zeigt sich auch hier wieder, daß der Einfluß von Phenobarbital auf einer Verkürzung des Zeitablaufs beruht.

3.3 Die Wirkung von Phenobarbital bei Applikation 12 Wochen nach Absetzen des Carcinogens

Angenommen, die Wirkung von Phenobarbital beruhe auf einer carcinogenen Potenz, so müßte es neue Inseln initiieren, wenn seine Applikation längere Zeit nach Beendigung der Carcinogen-Zufuhr begonnen wird; es müßten also erneut kleine Inseln auftauchen. Als Promotor dagegen könnte es zu einem so späten Zeitpunkt, wenn schon fast alle Inseln realisiert sind, nur noch das Inselwachstum beschleunigen. Um diese Frage zu untersuchen, gaben wir den Versuchstieren nach 18-tägiger Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA 12 Wochen lang Wasser und erst anschließend 5 Wochen lang Phenobarbital. Die Kontrollgruppe erhielt nach der DÄNA-Gabe 18 Wochen lang Wasser.
Vergleicht man die Verteilungen der Inselgrößen (s. Abb. 20), so bewirkt die späte Phenobarbital-Gabe in keinem DÄNA-Dosisbereich ein Auftreten von kleinen Inseln. Vielmehr wird die Größenverteilung durch die Phenobarbital-Nachbehandlung in die größeren Klassen verschoben. Daß die Inselzahl bei der Dosierung von 2 und 4 mg noch zunimmt, kann damit zusammenhängen, daß in diesem Dosisbereich nach 12 Wochen noch nicht alle Inseln manifest geworden sind.

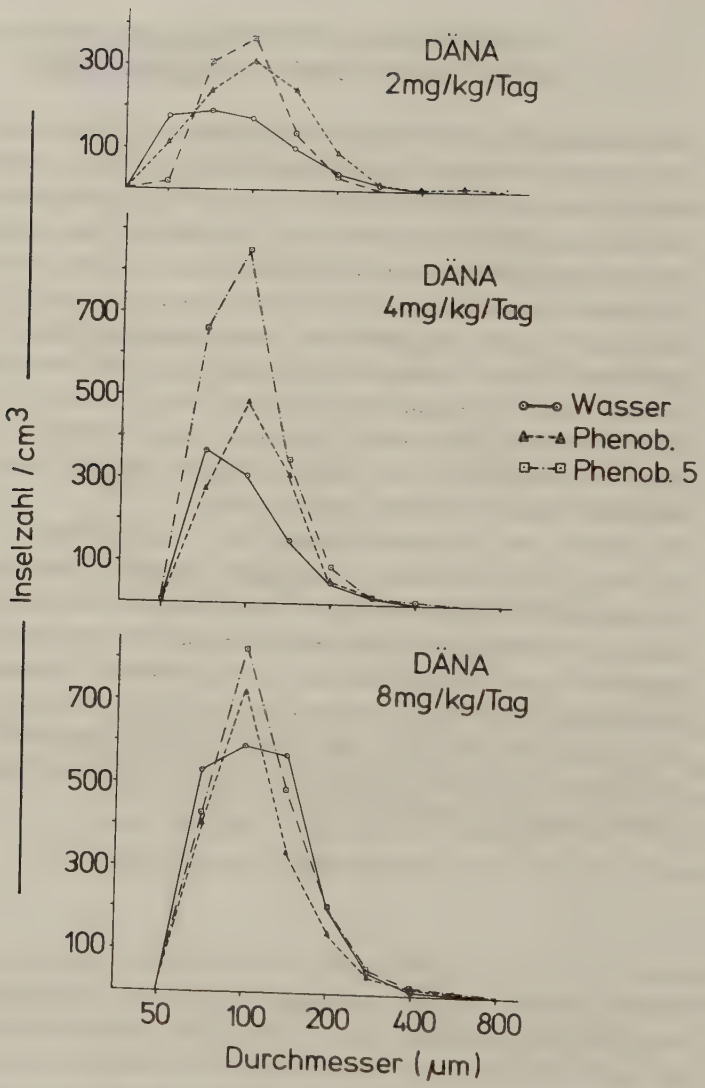
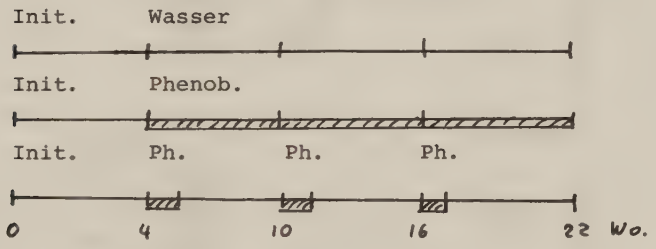


Abb. 20: Achtzehntägige Applikation von 2, 4 und 8 mg DÄNA/kg KG. Danach Wasser, Phenobarbital 17 Wochen oder Phenobarbital 5 Wochen im Anschluß an zwölfwöchige Wasser-Nachbehandlung. Vergleich der Verteilungen der Inselgrößen.

3.4 Intermittierende Phenobarbital-Nachbehandlung

Alle bisherigen Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß die Wirkung von Phenobarbital auf einem Wachstumsstimulus beruht, den es auf alle Zellen ausübt. Folglich müßte ein intermittierender Proliferationsreiz annähernd die gleiche Wirkung haben wie die kontinuierliche Phenobarbital-Gabe.
Vierwöchige Gabe von 6 mg DÄNA/kg KG diente als Initiation. Parallel zu den mit Wasser nachbehandelten Kontrolltieren gaben wir einer zweiten Tierreihe durchgehend Phenobarbital, während die dritte Gruppe im Abstand von 4 Wochen je eine Woche lang Phenobarbital erhielt.



In der Tat zeigt sich, daß nach intermittierender Phenobarbital-Behandlung Inselzahl und Inselfläche in der gleichen Größenordnung lagen wie nach kontinuierlicher Phenobarbital-Gabe (s. Abb. 21 u. 23).
Sowohl bei kontinuierlicher wie bei intermittierender Applikation äußert sich die Phenobarbital-Wirkung zu Beginn des Beobachtungszeitraums vor allem in einer Erhöhung der Inselzahl (s. Abb. 21 u. 23) später war auch in diesem Versuch eine deutliche Erhöhung neoplastischer Rieseninseln zu beobachten (s. Abb. 22)

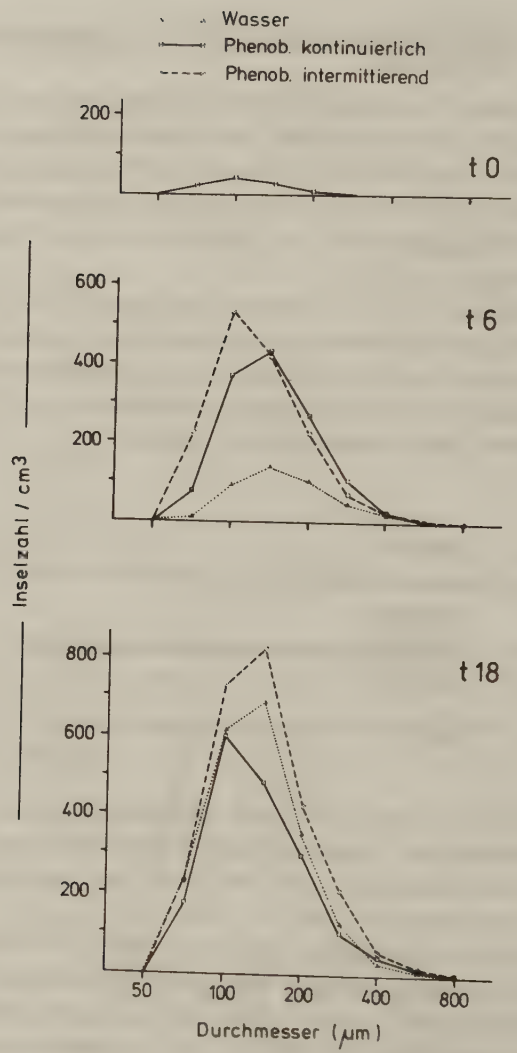


Abb. 21: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschl. Wasser, Phenobarbital 18 Wochen bzw. intermittierende einwöchige Phenobarb.-Applikation im Abstand von 6 Wochen. Vergleich der Verteilungen der Inselgrößen O, 6 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA- Zufuhr

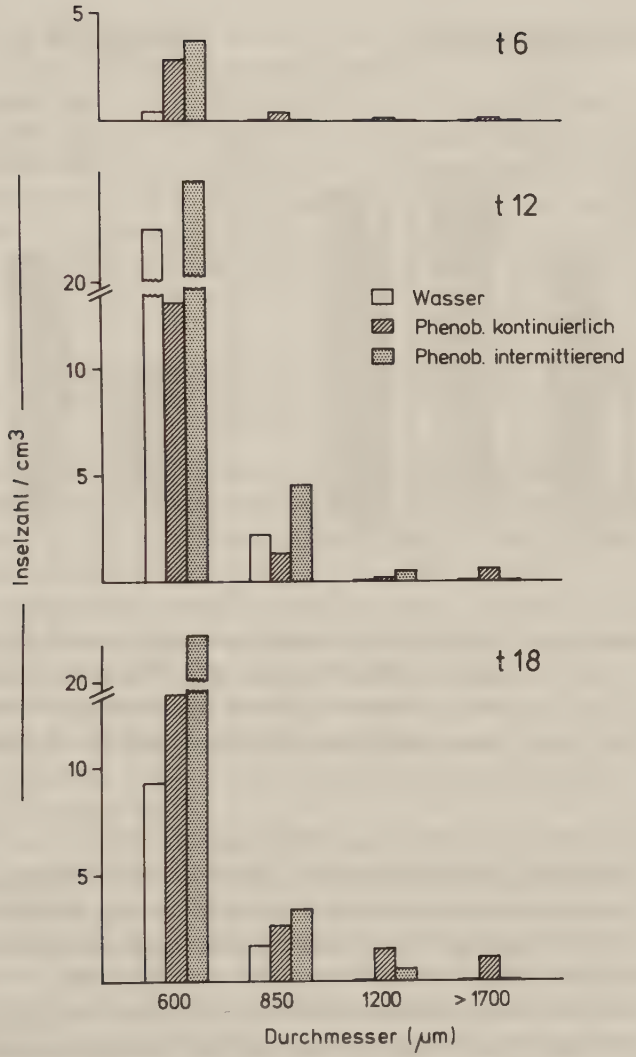


Abb. 22: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschl. Wasser, Phenobarbital 18 Wochen bzw. intermittierende einwöchige Phenobarb.- Applikation im Abstand von 6 Wochen. Darstellung der großen Inselklassen 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA- Behandlung

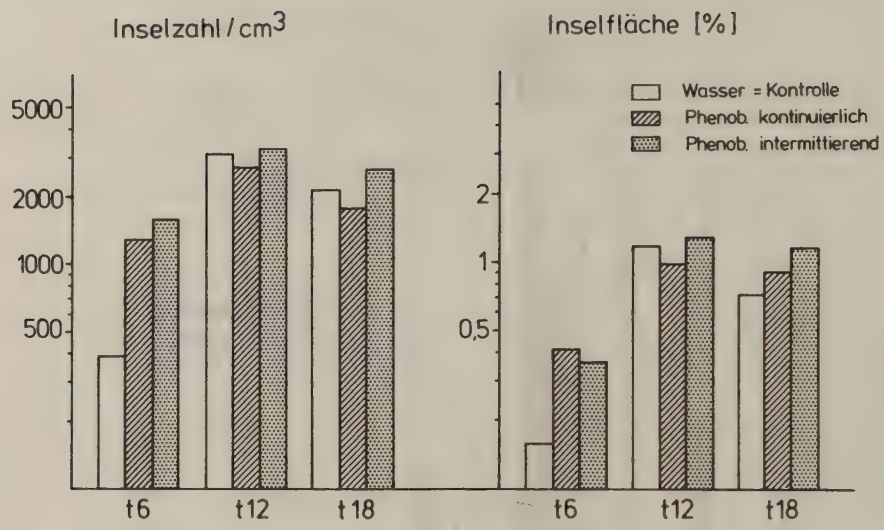


Abb. 23: Vierwöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA, anschließend Wasser, Phenobarbital 18 Wochen bzw. intermittierende einwöchige Phenobarbital-Applikation im Abstand von 6 Wochen.

Die Tatsache, daß eine Phenobarbital-Dosis bei intermittierender Zufuhr zumindest die gleiche Wirkung hat wie eine kontinuierliche Gabe der vierfachen Menge, ist mit einer irreversibelen Summationswirkung unvereinbar, widerspricht also der Annahme einer carcinogenen Potenz.
Auf der anderen Seite könnten sich aus diesem Ergebnis für den klinischen Gebrauch große Probleme ergeben. Die Tatsache, daß selbst eine kurzfristige, wiederholte Gabe von Phenobarbital dazu in der Lage ist, die Manifestation von präneoplastischen Herden intensiv zu steigern, wirft die Frage auf, ob dieser Effekt schon durch Dosen in der

Größenordnung erzielt werden kann, wie sie beim Menschen zur therapeutischen Anwendung kommen.
Die Phenobarbital-Dosen, die wir bei den bisher besprochenen Versuchen applizierten, überschreiten die üblichen therapeutischen Dosen um Zehnerpotenzen. So liegt die Maximal-Dosis an Phenobarbital, die bei der Behandlung von Epileptikern verabreicht wird, bei 5 mg/kg KG während die Versuchstiere bisher 100 mg/kg KG erhielten.

3.5 Dosisabhängigkeit der Phenobarbital-Wirkung auf das Inselwachstum

Bei diesem Versuch erhielten Ratten Phenobarbital in verschiedenen Dosierungen, nachdem sie vorher 7 Wochen lang mit 12 mg/kg KG N-Nitroso-Morpholin (NNM) vorbehandelt worden waren.
Die ausgewählten Dosierungen sind durch unterschiedliche biochemische und zelluläre Wirkungen gekennzeichnet (Remmer 1959, Kunz et al. 1966). Das Ausmaß der Phenobarbital-Wirkung ist zwar auch vom Tierstamm, dem Geschlecht und dem Alter des Versuchstieres abhängig, im allgemeinen lassen sich jedoch folgende Dosis-Bereiche unterscheiden:

0,75 mg/kg KG Phenobarbital: ruft beim erwachsenen Tier ausschließlich eine sehr schwache Induktion der Cytochrom-P_{450}-abhängigen Enzyme hervor.

7,5 mg/kg KG: bewirkt beim erwachsenen Tier nur eine geringgeradige und vorübergehende Lebervergrößerung, aber eine starke Induktion der P_{450}-abhängigen Enzyme.

75 mg/kg KG: In diesem Dosisbereich tritt neben der Enzyminduktion eine deutliche Lebervergrößerung auf.

Eine vierte Gruppe erhielt im Anschluß an die NNM-Initiation ausschließlich Wasser.

Als Kontrolle diente eine Tierreihe, die ebenfalls Phenobarbital in den obengenannten Dosierungen erhalten hatte, jedoch vorher nicht durch NNM initiiert worden war.
2, 6 und 18 Wochen nach Ende der Carcinogen-Zufuhr wurden aus jeder Versuchsreihe 6 Tiere untersucht.

Ergebnisse: Kontrolle: Phenobarbital zeigte keine Wirkung auf Zahl und Größe der Inseln nicht mit NNM vorbehandelter Tiere. Für alle Dosierungen lagen Inselzahl und Inselfläche in der gleichen Größenordnung wie bei den Tieren, die ausschließlich Wasser erhalten hatten. Es handelte sich hierbei um kaum mehr als 1-2 Inseln pro Präparat, die nur aus wenigen Zellen bestanden. Eine Aussage über Inselzahl und Inselgröße ist daher nur näherungsweise möglich. In den von uns verwandten Dosierungen scheint Phenobarbital die spontane Tumorrate nicht zu erhöhen.
Bei den Tieren, die vorher NNM erhalten hatten, war dagegen ein Einfluß von Phenobarbital feststellbar.
Nach 6 Wochen erhöht Phenobarbital die Anzahl der durch NNM initiierten Inseln, ohne daß jedoch eine Beziehung zur Dosis besteht (s. Abb. 24).

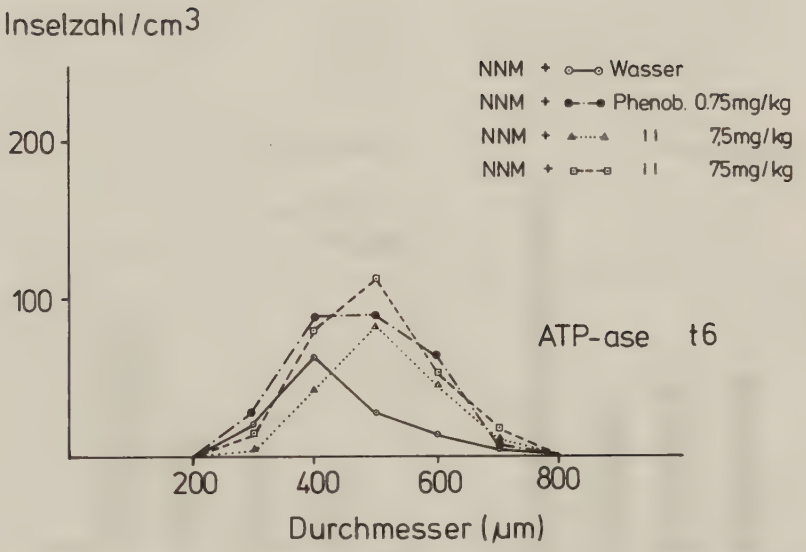


Abb. 24: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. über 6 Wochen. Vergleich der Größenverteilungen ATPase negativer Inseln

Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Phenobarbital-Dosierungen zeigten sich dagegen nach 18 Wochen (s. Abb. 25 und 26).

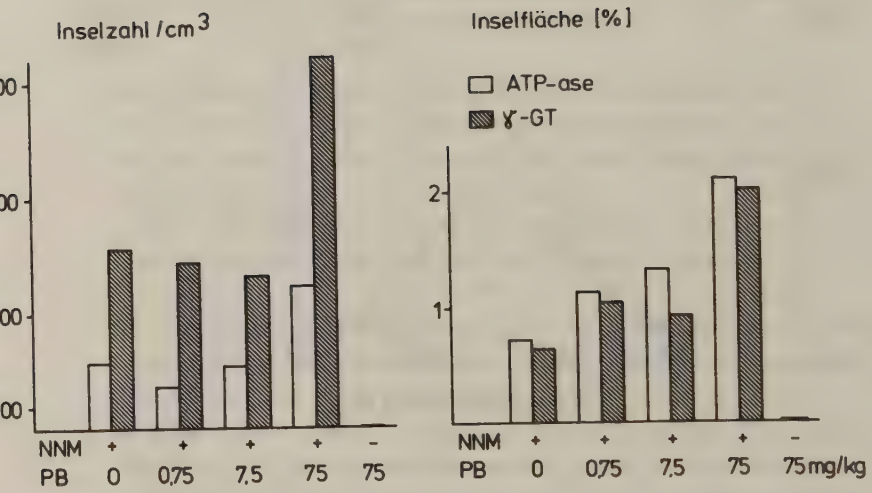


Abb. 25: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. Vergleich von Zahl und Gesamtfläche ATPase-negativer und γ-GT positiver Zellareale 18 Wochen nach Beendigung der NNM-Zufuhr.

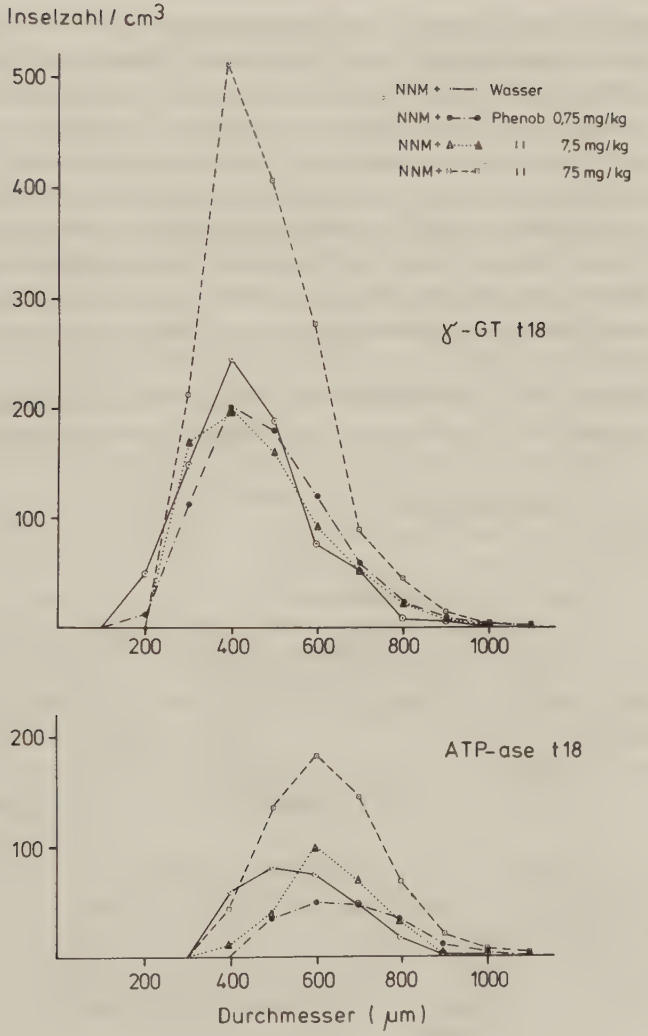


Abb. 26: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. Vergleich der Größenverteilungen ATPase-negativer und γ-GT positiver Inseln 18 Wochen nach Beendigung der NNM-Zufuhr.

Nur in sehr hoher, proliferationsanregender Dosierung ist Phenobarbital dazu in der Lage, die Anzahl der durch NNM erzeugten Inseln zu erhöhen. Bei geringeren Dosierungen, die zwar eine Enzyminduktion, nicht aber eine Lebervergrößerung bewirken, liegt die Inselzahl in der Größenordnung der mit Wasser nachbehandelten Tiere.
Im Gegensatz dazu bewirken auch diese niedrigen Dosierungen bereits eine Erhöhung der Gesamtinselfläche, die darauf beruht, daß bei allen mit Phenobarbital nachbehandlten Tieren die Größe der Einzelinsel erhöht ist (s. Abb. 25)

In doppelt logarithmischer Darstellung ergibt sich folgender Wachstumsverlauf der Inselflächen (s. Abb. 27).

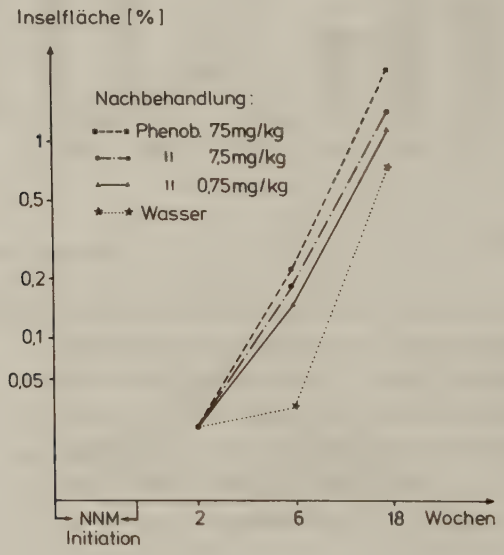


Abb. 27: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. Untersuchungszeitpunkte 2, 6 und 18 Wochen nach Ende der NNM-Behandlung.

In jeder proliferierenden Leberzelle steigt die Aktivität der Gamma-Glutamyl-Transferase (γ-GT) stark an. Dieses Phänomen tritt sowohl bei Zellregeneration nach toxischer Zellschädigung und nach Teilhepatektomie, als auch in malignem Lebergewebe auf (Fiala et al 1972). Die γ-GT eignet sich somit als unspezifischer Indikator für eine erhöhte Proliferationstendenz. Deshalb fertigten wir Serienschnitte an, in denen wir ATPase und γ-GT nachwiesen. Wir wollten feststellen, ob sich die einzelnen ATPase-negativen Herde hinsichtlich ihrer Proliferationstendenz unterscheiden und ob die Herde unter Phenobarbital einen stärkeren Malignitätsgrad erreichen, also eine erhöhte Proliferation zeigen.
Hierbei ist eine auffallende Parallelität zwischen der Anzahl und Größe ATPase-negativer und γ-GT positiver Inseln zu beobachten. Zu dem entscheidenden Zeitpunkt nach 18 Wochen zeigt sich auch bei der γ-GT, daß nach einer Behandlung mit 75 mg Phenobarbital die meisten Inseln entstehen (s. Abb. 25 und 26). Aber auch die nur mit Wasser oder niedrigen Dosen Phenobarbital nachbehandelten Tiere weisen ein große Zahl γ-GT positiver Inseln auf. Vergleicht man das Verhältnis γ-GT positiver zu ATPase negativen Inseln, so ändert sich dieser Quotient mit der Erhöhung der Phenobarbital-Dosis nicht:

Tabelle 3: Siebenwöchige Behandlung mit 12 mg NNM/kg KG Anschließend 18 Wochen Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG. Verhältnis der Zahl γ-GT positiver zu ATPase negativen Arealen.

	Wasser	Ph: 0,75	7,5	75
γ-GT / ATPase	2,71	3,89	2,43	2,61

Beim Vergleich der Serienschnitte fällt auf, daß jede γ-GT positive Insel auch ATPase-Ausfall zeigt und daß keine ATPase-negative Inseln ohne positive γ-GT zu finden sind. Die erhöhte Zahl γ-GT positiver Inseln erklärt sich dadurch, daß vor allem bei großen ATPase-negativen Inseln nicht der ganze Zellkomplex erhöhte γ-GT-Aktivität zeigt, sondern nur Teilgebiete, die meist an ein Periportalfeld angrenzen: (s. Abb. 28)
Dementsprechend ist beim Vergleich der Größenverteilungen zu erkennen, daß die γ-GT-positiven Inseln im Schnitt erheblich kleiner sind als die ATPase-negativen Areale (s. Abb. 26). So erklärt sich auch die Tatsache, daß die Gesamtfläche der ATPase-negativen und der γ-GT positiven Inseln nahezu identisch ist (s. Abb. 25).
Es liegt die Vermutung nahe, daß die γ-GT-Aktivität einer Zelle unter anderem auch von ihrer Blutversorgung abhängt. Die γ-GT erfüllt in der Leberzelle wahrscheinlich die Funktion, Aminosäuren in die Zelle zu transportieren (Orlowski et al. 1970). Diese Aminsäuren werden der Leber im Pfortaderblut zugeführt und somit ist verständlich, daß die γ-GT-Aktivität vor allem im Periportalfeld erhöht ist.

Wegen der weitgehenden Übereinstimmung von ATPase- und γ-GT-Markierung ist die γ-GT also nicht zur Differenzierung präneoplastischer Herde geeignet. Da ihre Aktivät außerdem von den funktionellen Erfordernissen im Zellverband abhängt, ist sie zur Erfassung präneoplastischer Veränderungen weniger gut geeignet als die ATPase.

Zur Aufstellung der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung werden aus Abb. 27 die Zeiten bis zum Erreichen von 1% Inselfläche ermittelt: Für alleinige NNM-Applikation erhält man 210 Tage - Phenobarbital in den verschiedenen Do-

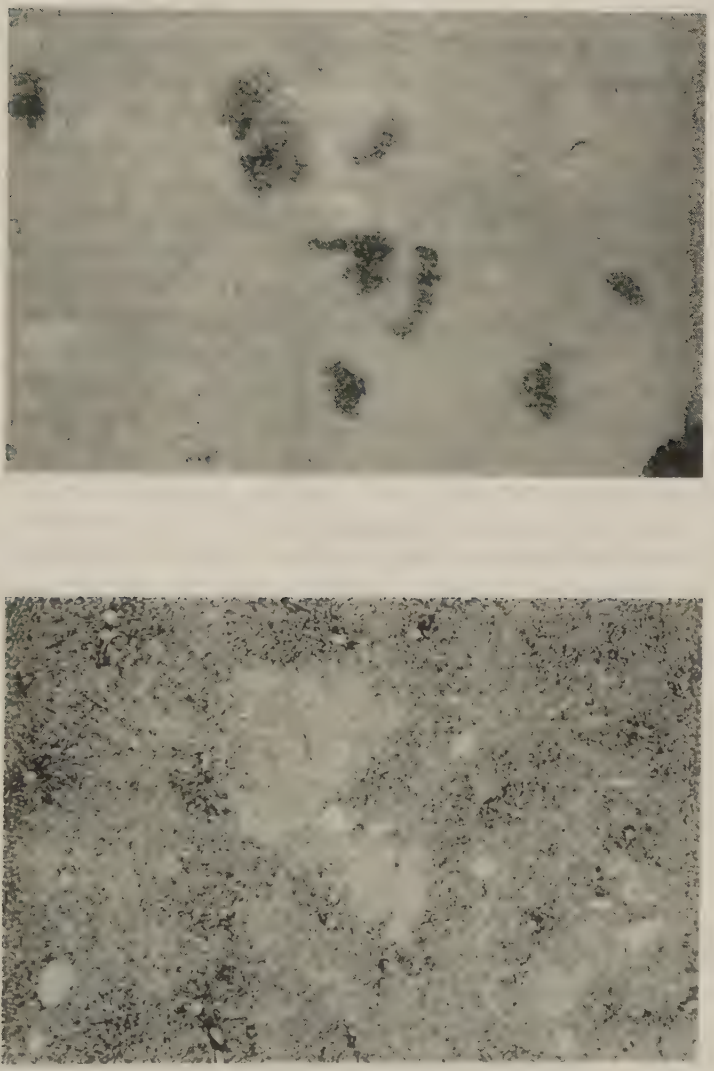


Abb. 28: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend 18 Wochen Wasser. Parallelschnitte mit Darstellund der γ-GT und der ATPase

sierungen verkürzt die Zeit auf 203, 180 und 140 Tage. Hieraus ergibt sich die Darstellung nach Druckrey folgende Kurve:

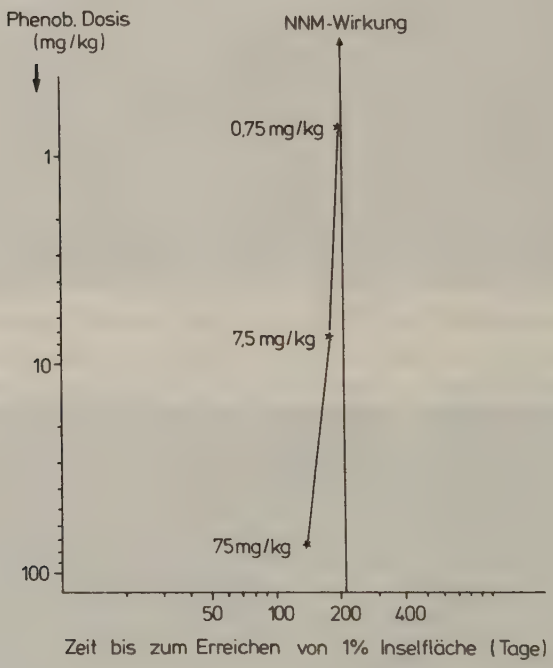


Abb. 29: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 ml/kg KG x die. Beziehung zwischen Zeit bis zum Erreichen von 1% Inselfläche und Phenobarbital-Dosis.

Diese Abbildung spiegelt jedoch nicht die realen Verhältnisse wider, da die Wirkung durch die initiale NNM-Applikation mitverursacht ist und so die Wirkung vor allem der kleinen Phenobarbital-Dosis überproportional gesteigert dargestellt ist. Um den Effekt zu erhalten, der ausschließlich durch Phenobarbital hervorgerufen wird, muß deshalb der Einfluß des initialen Carcinogens subtrahiert werden.
Eine Möglichkeit hierfür ergibt sich aus der Umrechnung der Phenobarbital-Wirkung in NNM-Äquivalente. Wie aus der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung für NNM in Abb. 30 ersichtlich, entspricht die initiale Carcinogen-Wirkung einer kontinuierlichen täglichen Dosis von 3,4 mg NNM/kg KG x die, Phenobarbital erhöht je nach Dosierung diese NNM-Äquivalent-Dosis auf 3,6 mg, 5,6 mg und 11 mg. Dies entspricht einer Dosiserhöhung durch Phenobarbital von 0,2/2,2 bzw. 7,6 mg. Ermittelt man mit Hilfe der NNM-Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung die Zeiten, welche diesen Dosiserhöhungen entsprechen, so erhält man für jede Phenobarbital-Dosis ein Maß für die alleinige Wirkung. Abb. 31 zeigt die Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung, welche hieraus resultiert.

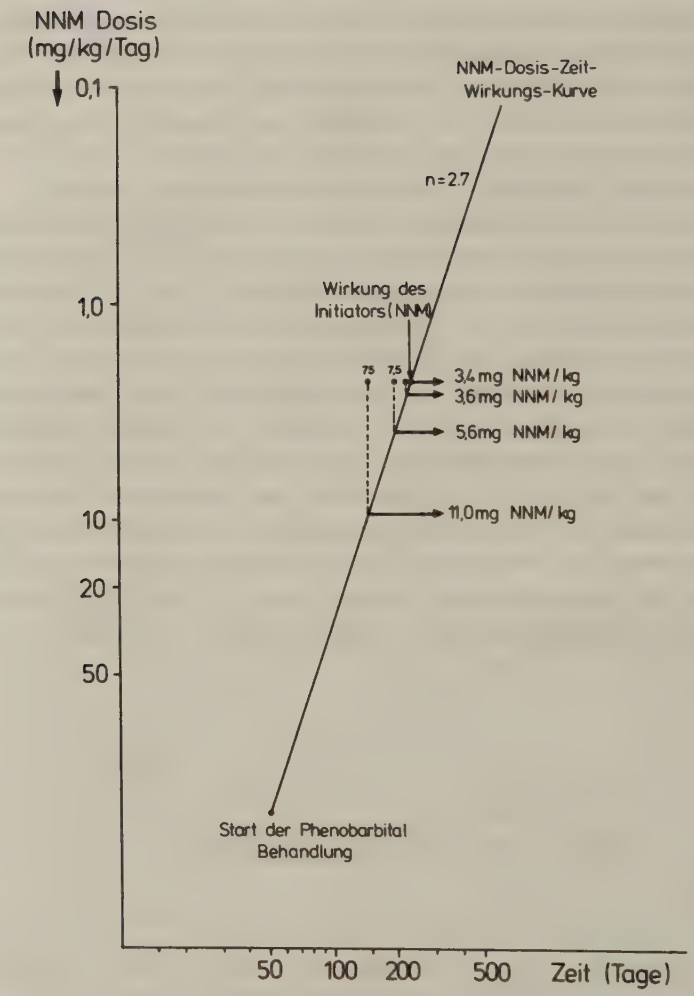


Abb. 30: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KH. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. Graphische Ermittlung der Wirkungssteigerung durch Phenobarbital anhand der NNM-Dosis-Zeit-Wirkungskurve.

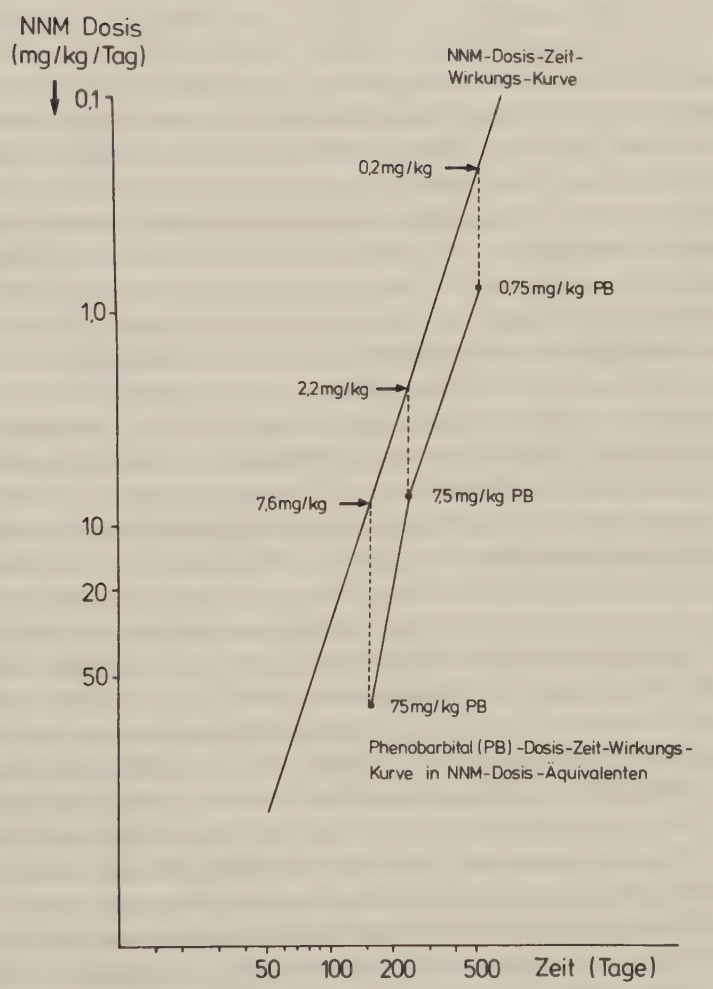


Abb. 31: Siebenwöchige Applikation von 12 mg NNM/kg KG. Anschließend Wasser bzw. Phenobarbital in einer Dosierung von 0,75-7,5 und 75 mg/kg KG x die. Dosis-Zeit-Wirkungskurve in NNM-Äquivalenten von Phenobarbital.

4. DISKUSSION

Wie in der Einleitung ausführlich dargelegt, wurde bei chronischer Verfütterung sehr hoher, zu Lebervergrößerung führender Dosen von Arzneistoffen wie Phenobarbital, Clofibrat, sowie von Insektiziden wie DDT und Dieldrin, eine signifikante Erhöhung der Manifestation hepatozellulärer Tumoren beobachtet. Da nach Definition der International Agency for Research of Cancer (IARC) jede Substanz als Carcinogen einzustufen ist, die im Tierversuch die Tumorinzidenz erhöht, wurden diese Substanzen als schwache Carcinogene klassifiziert. Es ist jedoch immer noch umstritten, ob diese Bewertung wissenschaftlich gerechtfertigt ist. Eine tumorigene Wirkung der inkriminierten Substanzen ist nämlich nur bei einigen Mäuse- und Rattenstämmen beobachtet worden, die eine relativ hohe Spontan-Tumorrate aufweisen, die also bereits durch eine unbekannte "endogene Grundnoxe" initiiert sein müssen. Hierfür könnte der im Tierversuch mehrfach nachgewiesene Gehalt an Nitrosaminen und Aflatoxinen in der Nahrung verantwortlich sein oder das Vorkommen endogener bzw. viraler onkogener Faktoren. Für die letztgenannte Annahme spricht die Beobachtung von Jones und Butler, die virusähnliche Partikel in "spontanen" und Phenobarbital- induzierten Lebertumoren von CF1- Mäusen nachwiesen (Jones et al. 1975). Somit könnte die Steigerung der Inzidenz von Lebertumoren durch Fremdstoffe auf einer promovierenden Wirkung beruhen. Dafür, daß Phenobarbital eine promovierende Potenz besitzt, sprechen auch die erwähnten Untersuchungen von Peraino (1971), in denen Phenobarbital nur dann zu einer Manifestation von Lebertumoren führte, wenn eine Behandlung mit sehr geringen, unterschwelligen Dosen eines Lebercarcinogens vorausgegangen war. Aus diesen Forschungsergebnissen kann jedoch nicht zweifelsfrei auf das Vorliegen einer aus-

schließlich promovierenden Wirkung geschlossen werden, da sich diese Befunde auch dadurch erklären ließen, daß eine möglicherweise sehr schwache carcinogene Potenz von Phenobarbital sich zu der Wirkung des initial applizierten Carcinogens im Sinne einer Syncarcinogenese addieren könnte. Sowohl Syncarcinogenese wie Cocarcinogenese führen somit letztlich zu einer erhöhten Tumorausbeute und sind daher nicht alleine durch die Tumorinzidenz zu differenzieren. Diese Schwierigkeit besteht nicht nur bei den angeführten Substanzen, an denen das Phänomen der Lebervergrößerung und deren toxikologische Bedeutung eingehend untersucht wurden, sondern tritt in gleichem Maße bei der Risikobeurteilung jedes Fremdstoffs auf, der zu einer Lebervergrößerung führt. Ein Beispiel hierfür ist das Antihistaminikum Metapyrilen, das aus einer Reihe, schon seit langem zugelassener Arzneistoffe willkürlich ausgewählt und erneut einem Carcinogenitätstest unterzogen wurde. Dabei führte es im Tierversuch mit einem sensibelen Rattenstamm in hohen, lebervergrößernden Dosen zu einer Erhöhung der Lebertumorrate, nicht jedoch jedoch in niedrigerer Dosierung oder bei unempfindlichen SD- Ratten. Die Zulassung zur therapeutischen Anwendung wurde daraufhin widerrufen. Dieser Fall zeigt, daß eine Differenzierung zwischen carcinogener und promovierender Wirkung auch von großer praktischer Bedeutung ist.
In der Einleitung wurde bereits ausgeführt, daß die Unterscheidung durch die Analyse der Dosis- Zeit- Wirkungs- Beziehung möglich sein müßte, die in der Darstellung nach Druckrey eine Gerade mit für jedes Carcinogen charakteriszischer Lage und Steigung ergibt. Bei Gabe eines zweiten Carcinogens kommt es durch die Summation beider carcinogener Potenzen zu einem Verlauf der Dosis- Zeit- Wirkungskurve, der in hohen Dosierungen der Gerade des variablen Carcinogens entspricht, sich in niedrigen Dosen hingegen asymptotisch der Wirkung des fixen Carcinogens nähert (s. Abb. 32). Da der Effekt eines Promotors auf einem kon-

zentrationsabhängigen Wachstumsstimulus beruht, können geringe Dosen, die den Zellmetabolismus noch nicht beeinflussen, keine Wirkung zeigen. Außerdem ist der maximale Effekt durch das Ausmaß der initialen Carcinogen- Wirkung limitiert. Daher ist anzunehmen, daß die Dosis- Zeit- Wirkungs- Beziehung eines Promotors S- förmig verläuft.

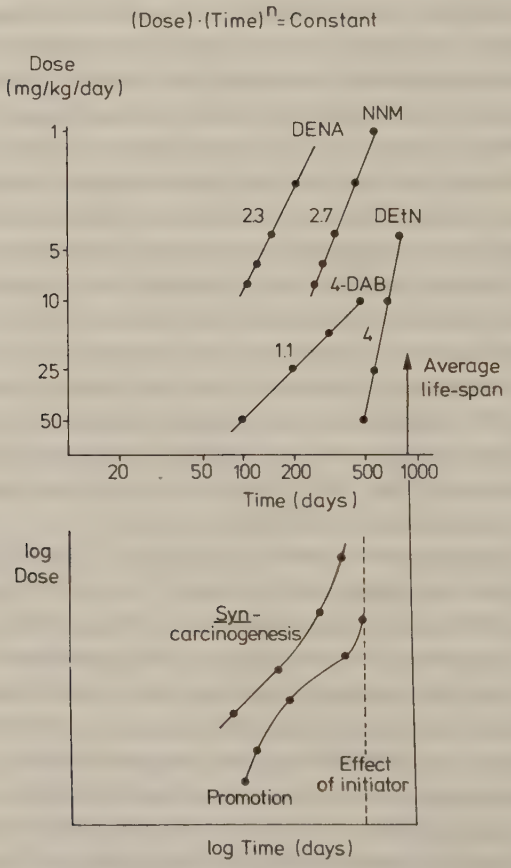


Abb. 32: Dosis- Zeit- Wirkungs- Charakteristiken
oben: experimentell ermittelte Verläufe für Carcinogene
unten: theoretisch zu erwartende Verläufe für Syncarcinogenese und Promotion

Die Charakterisierung dieser Verläufe erfordert die sehr exakte Bestimmung der carcinogenen Effektivität über einen weiten Dosisbereich. Die Differenzierung von carcinogener und promovierender Wirkung einer Substanz ist also nur möglich, wenn auch der Effekt niedriger, nicht zu Lebervergrößerung führender Dosen erfaßt werden kann. Da bei diesen geringen Dosen innerhalb der Lebenszeit des Versuchstiers noch keine Tumoren auftreten, ist die Zielgröße Tumorentstehung für die Aufstellung von Dosis- Zeit-Wirkungsbeziehungen ungeeignet. Als eine geeignete Methode zur frühzeitigen quantitativen Erfassun der carcinogenen Wirkung in niedrigen Dosen hat sich die Darstellung präneoplastischer ATPase- freier Areale erwiesen. Es ist zwar noch unklar, ob diese irreversibelen Enzymdefekte eine kausale Bedeutung für den Cancerisierungsprozeß besitzen, wichtig ist jedoch, daß zwischen der Carcinogen- Dosis und der Inselfläche eine direkte Korrelation besteht. Nimmt man das Erreichen einer definierten Inselfläche als Zielgröße, so folgt die Dosis- Zeit- Wirkungskinetik wie bei dem Meßparameter Tumorentstehung der Formel $d \times t^n = const.$, wobei der Graph der präneoplastischen Veränderungen die gleiche Anstiegssteilheit hat, wie für das Erreichen des Tumortodes. Man erhält also in beiden Fällen das gleiche n (Kunz et al. 1978). Diese enzymfreien Areale bieten außerdem durch einen charakteristischen Wachstumsverlauf nach kontinuierlicher und diskontinuierlicher Carcinogen- Applikation eine zusätzliche Differenzierungsmöglichkeit zwischen carcinogener und promovierender Wirkung.

41. Zur Entstehung ATPase- freier Inseln

Auf der Suche nach einem Korrelat früher neoplastischer Stadien beschrieb Friedrich Freksa 1964 enzymfreie Areale, die nach Gabe von Lebercarcinogenen sehr frühzeitig auftraten. Diese sogenannten Inseln zeigten einen Ausfall der ATPase (Schauer et al, 1968) oder der Glucose- 6- Phosphatase- Reaktion, positive Glykogen- Speicherung (Bannasch 1968) oder positive γ- GT (Fiala 1972). Die Tatsache, daß sich die verschiedenen Inseln untereinander in der Kombination dieser enzymatischen Merkmale unterscheiden, die Zellen einer Insel jedoch ein homogenes Enzymmuster aufweisen, deutet auf eine monoklonale Entstehung hin.
Diese enzymdefekten Zellen entstehen im periportaten Bereich. Hier, also im Bereich der Glisson'schen Trias, liegt nach Untersuchungen von Rappaport über Leberzellregeneration und Zellmutation das Keimgewebe (Rappaport, 1954). Durch Zellteilungen in diesem Stammgewebe werden ständig neue Leberzellen gebildet, die dann unter zunehmender Differenzierung auf das Läppchen- Zentrum zuwandern, wo die absterbenden Zellen schließlich über die Zentralvene eliminiert werden. Nach Untersuchungen von Scherer (1970) dauert dieser Prozeß bei der Ratte etwa 120- 150 Tage. Auch für die ATPase- freien Areale läßt sich diese Bewegung in Richtung auf die Zentralvene nachweisen (Friedrich- Freksa 1969). Analog zu den normalen Leberzellen wäre auch für die ATPase- freien Inselzellen zu erwarten. daß sie nach ca. 120 Tagen, der Lebensdauer einer Leberzelle, absterben. Für einen Teil der Inseln trifft dies auch zu, wie sich im Abfall der Inselzahl zu diesem Zeitpunkt zeigt. Die Persistenz eines Teils der Inseln, welche um die Zentralvene akkumulieren, kann nur darauf beruhen, daß bei ihnen die Proliferationsgeschwindigkeit die Zahl der absterbenden Zellen

übertrifft. Es findet somit eine Selektion der Inseln mit größerer Zellteilungsrate, das heißt fortgeschrittenem neoplastischen Charakter, statt. Diese Annahme wird durch Untersuchungen von Rabes gestützt, der nachwies, daß ein Teil der enzymfreien Areale etwa vom 90. Tag ihrer Entstehung an eine stark erhöhte Proliferationsrate zeigen (Rabes 1972). Wichtig für das Verständnis der Beziehung zwischen Carcinogen- Wirkung, Enzym-Defekten und Tumorbildung ist die Beobachtung, daß diese verstärkt proliferierenden Inseln zu einem sehr hohen Anteil den Ausfall mehrere Enzyme aufweisen. Wenn man annimmt, daß die Enzymdefekte Folge isolierter somatischer Mutationen sind, wäre zu folgern, daß bereits die Ausgangszelle dieser Inseln eine größere Zahl genetischer Schäden trägt.

Das Bestehen einer quantitativen Beziehung zwischen der Zahl Carcinogen- bedingter Genschäden und der Zahl enzymdefekter Herde wurde von Scherer und Emmelot experimentell nachgewiesen (1980). Sie fanden nach einmaliger Applikation verschiedener DÄNA- Dosen eine direkte Proportionalität zwischen applizierter Carcinogen- Dosis und Inselzahl. Dies spricht dafür, daß für den ATPase- Defekt nur ein Treffer erforderlich ist. Da Enzymdefekte erst nach Mutation beider für die Enzymsynthese verantwortlicher alleler Genloci manifest werden, stellt sich die Frage, wie bereits ein einziger Treffer zum irreversiblen Enzymverlust führen kann. Scherer erklärt dies damit, daß der mutierte Strang falsche Enzym- Subunits bilden könnte, die sich mit den Subunits des anderen Strangs verbinden, und so die Synthese eines funktionsfähigen Enzyms verhindern. Als andere Erklärungsmöglichkeit führt er an, daß durch Chromosomen- Translokation eine heterozygot rezessive Mutation manifest werden könnte.

Bei kontinuierlicher Applikation von DÄNA und NNM steigen dagegen für alle untersuchten Dosisgruppen die Inselzahlen proportional dem Quadrat der Applikationszeit an. Aus dieser Beziehung folgt, daß zur Entstehung des Enzymdefekts zwei Treffer nötig sind (Port 1981). Auch in diesem Versuch ergibt sich allerdings bei Auftragen der Inselzahl in Abhängigkeit von der Carcinogen- Dosis eine lineare Beziehung. Die Abhängigkeit der Inselzahl von der Carcinogen- D o s i s deutet somit auf einen 1- Treffer- Mechanismus hin, die Abhängigkeit von der Z e i t auf zwei Treffer. Diese widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich miteinander in Einklang bringen, wenn man annimmt, daß für die phänotypische Manifestation des Enzymdefekts zwei Treffer nötig sind. aber nur einer von diesen beiden Treffern Carcinogen- abhängig ist, der andere hingegen Zeit- abhängig. Es ist eine naheliegende Vermutung, daß das zellbiologische Äquivalent des Carcinogen- abhängigen Treffers in einer rezessiven Mutation besteht. Aufgrund der Doppelsträngigkeit der DNS bedeutet dies, daß die Mutation nach einer Zellteilung heterozygot vorliegt, wegen ihres rezessiven Charakters jedoch nicht exprimiert wird.
Vieles spricht dafür, daß die zelluläre Grundlage des zweiten, zeitabhängigen Trefferäquivalents in Zellteilungsvorgängen besteht, die über atypische Rekombination der Chromosomen zu einem heterozygoten, phänotypisch manifesten Defekt führt. Dieses Konzept ist vorerst noch weitgehend hypothetisch, es ist jedoch am besten geeignet, die Beobachtungen über den Verlauf der Inselentwicklung nach kontinuierlicher und diskontinuierlicher Carcinogen- Einwirkung einheitlich zu erklären.

42. Zum Wachstumsverlauf ATPase-freier Inseln und seiner Beeinflussung durch Phenobarbital

In Übereinstimmung mit anderen Untersuchern wurde in den Versuchen der vorliegenden Arbeit ein typischer Verlauf für Entstehen und Wachstum ATPase- freier Inseln gefunden. Das erste Auftreten von ATPase- defekten Zellarealen läßt sich erst einige Wochen nach Beginn der Einwirkung des Carcinogens beobachten. Das heißt für unsere Versuche, daß sich bei 3- 4- wöchiger Nitrosamin- Applikation zum ersten Untersuchungszeitpunkt nur wenige Inseln finden lassen. Auch nach Absetzen des Carcinogens entstehen noch eine Zeitlang neue Inseln, die Steigung der Inselzahl wird jedoch zunehmend geringer. Nach etwa 12 Wochen erreicht sie ihr Maximum und fällt dann wieder etwas ab. Beobachtet man das Inselwachstum über einen längeren Zeitraum hinweg, so stellt sich schließlich ein Gleichgewichtszustand ein, in dem die Inselzahl konstant bleibt, durch das Wachstum der Einzelinsel die Gesamtinselfläche jedoch weiterhin zunimmt.
Das Phänomen, daß die Inseln erst einige Wochen nach Carcinogen- Einwirkung auftreten, erklärt Pitot (1978) damit, daß die Inseln bereits zum Zeitpunkt des Absetzens des Carcinogens existieren, wegen ihrer Kleinheit jedoch übersehen werden, da sie erst ab einer bestimmten Größe registrierbar seien. Dem sind die Ergebnisse unserer Versuche entgegenzuhalten, in denen bereits Enzymausfälle einer einzigen Leberzelle gut zu erkennen waren (s. Abb. 33).
Scherer diskutiert als weiter Möglichkeit für das spätere Auftreten neuer Inseln, daß selbst nach Alteration des Gens, welches für die ATPase- Synthese verantwortlich ist, die Aktivität dieses Enzyms über eine längere Zeit per-

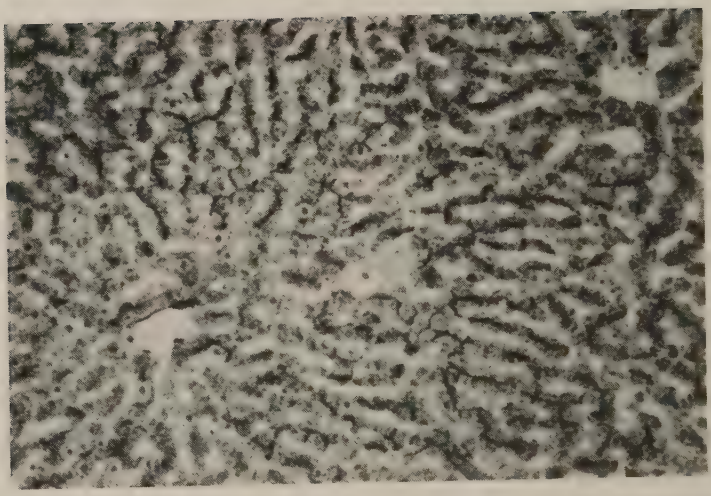


Abb. 33: Darstellung einzelner ATPase- freier Zellen

sistiert, weil seine biologische Halbwertszeit groß ist. Dieser Hypothese widerspricht die eigene Beobachtung, daß nach Applikation proliferationsstimulierender oder toxischer Substanzen die ATPase- Aktivität im Zentralbereich innerhalb weniger Tage verschwindet.
Einleuchtender kann diese Verlaufscharakteristik auf der Basis der Überlegungen über die zytogenetischen Grundlagen des Enzymdefekts erklärt werden. Wie bereits dargelegt wären nämlich im Anschluß an die somatische Mutation mindestens zwei Zellteilungen bis zur Manifestation der ATPase-defekten Zelle nötig, wovon eine zu einer atypischen Chromosomenverteilung führen muß. Dies erklärt, warum es nach Ende der Carcinogenzufuhr eine Zeitlang dauert, bis die ersten Inseln entstehen, und warum auch noch längere Zeit nach Absetzen des Carcinogens neue Inseln auftreten.

In dieses Bild fügt sich schlüssig ein, daß der dynamische Ablauf der Inselentstehung von der Dosis des applizierten Carcinogens abhängig ist. Nach Rajewsky (1972) wirken Carcinogene nicht nur initiierend, sondern in Abhängigkeit von ihrer Konzentration auch langdauernd proliferationssteigernd auf die Leberzelle. Das heißt, mehrere Zellteilungen laufen in kürzerer Zeit ab, folglich werden die Inseln früher manifest. Für die Annahme, daß im Zusammenhang mit der Proliferationssteigerung stehende atypische Zellteilungsvorgänge das Korrelat des zweiten, zeitabhängigen Treffers darstellen, spricht, daß nach Applikation aller Carcinogene gehäuft asymmetrische Chromosomen-Rekombinationen, wie gestörte Mitosen, Sister- Chromatid-Austausch und Segregation auftreten (Kinsella et al., 1978; Radman, 1981; Cairns, 1981).

In unsereren Versuchen bewirkte Phenobarbital im Anschluß an die Carcinogen-Gabe eine Beschleunigung des Insel-Zyklus, d.h., die Inseln traten früher auf und die maximale Inselzahl wurde früher erreicht. Da unter Phenobarbital-Nachbehandlung wie bei der Kontrolle nach dem Erreichen des Maximums etwa von der 12. Woche an auch bei anhaltender Weiterapplikation keine neuen Inseln mehr entstehen, ist nicht anzunehmen, daß die Substanz eine carcinogene Potenz besitzt, sie würde sonst noch weitere Inseln initiieren. Deshalb kann man davon ausgehen, daß Phenobarbital ausschließlich einen Proliferationsreiz auf die Leberzelle ausübt und durch die größere Zahl von Zellteilungen pro Zeiteinheit zur schnelleren Manifestation des Enzymdefekts führt.
Daß nicht der Proliferationsreiz selbst, sondern hierbei auftretende atypische Chromosomen-Rekombinationen letztlich für den promovierenden Effekt von Phenobarbital verantwortlich sind, geht aus dem früheren Auftreten großer Inseln mit fortgeschrittenen Malignitätskriterien unter

Phenobarbital- Nachbehandlung hervor. Bei kontinuierlicher Zufuhr erhöht Phenobarbital nämlich nur zu Beginn der Applikation die Zellteilungsrate, bis die funktionelle Anpassung erreicht ist. Deswegen kann das schnellere Wachstum dieser neoplastischen Knoten nicht dadurch erklärt werden, daß die Inseln unter dem fortdauernden Phenobarbital- Stimulus schneller wachsen. Vielmehr muß das entscheidende Ereignis innerhalb der ersten Woche der Phenobarbital-Behandlung stattgefunden haben. Das heißt, daß der gleiche Vorgang, der für die schnellere Manifestation der ATPase- defekten Insel verantwortlich ist, dazu führt, daß auch andere rezessive Mutationen schneller homozygot und damit manifest werden. Im Fall der neoplastischen "Rieseninseln" hieße dies die Manifestation einer Störung der Wachstumsregulation, die bewirkt, daß die betreffende Zellpopulation schneller als das übrige Gewebe wächst.
Diese von uns theoretisch postulierten atypischen Chromosomen- Rekombinationen lassen sich auch experimentell nachweisen. Zytologische Analysen zeigen, daß die Phenobarbital-induzierte Leberhypertrophie mit einer ausgeprägten Polyploidisierung einhergeht, die zum Teil nicht auf DNS- Neusynthese, sondern auf einer Fusion der Nuclei doppelkerniger Zellen beruht. Bei Erreichen der funktionellen Adaptation und besonders deutlich nach Absetzen von Phenobarbital kommt es zu einer Rückbildung ohne das Auftreten von Mitose- Figuren. Aus Ploidie-, Thymidin- und Mitose- Index konnte geschlossen werden, daß es während dieses Prozesses zum Ploidie- Wechsel durch Fusions- und Rückteilungsvorgänge kommt (Böhm et al. 1981, Kunz et al. 1981). Dieser Vorgang schafft nach Radman (1981) die Voraussetzung für eine ungeordnete Verteilung homologer Chromosomen, ein Prozeß, durch den eine heterozygote Mutation homozygot werden kann.

Ein weiteres Argument dafür, daß Phenobarbital seine Wirkung vor allem zu Beginn der Applikationszeit ausübt, zu dem Zeitpunkt also, zu dem es atypische Chromosomen- Rekombinationen hervorruft, ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit. Intermittierende Phenobarbital- Behandlung führte nämlich zu einer vergleichbaren promovierenden Wirkung wie die kontinuierliche Applikation einer erheblich höheren Dosis.

Durch die in dieser Arbeit erstmals vorgenommenen detaillierten Analysen der Gesetzmäßigkeiten des Verlaufs von Zahl und Größe enzymdefekter Areale nach Beendigung der Carcinogen- Einwirkung wurden die bisher vorliegenden Daten über den Wachstumsverlauf erweitert. Es war zwar bekannt, daß nach Absetzen des Carcinogens die Zahl der Inseln noch eine Zeitlang ansteigt und dann ein Plateau erreicht. Erst die eigenen Versuche haben jedoch gezeigt, daß der Zeitpunkt des Erreichens dieses Maximums von der Dosierung des initialen Carcinogens abhängt und daß die Inselzahl anschließend wieder abfällt. Die Annahme, von der wir aufgrund der vorliegenden Daten bei der Versuchsplanung ausgegangen waren, daß das Maximum bereits nach 12 Wochen erreicht wird, erwies sich nur für die hohen Dosierungen als zutreffend. Daher ergaben sich Probleme für die Interpretation und die quantitative Auswertung der Versuche. Zum Zeitpunkt 18 Wochen nach Ende der Carcinogen- Zufuhr waren die Inselzahlen bei den hohen Carcinogen- Dosierungen bereits wieder abgefallen, während die Tiere, die mit geringen Dosen vorbehandelt worden waren, gerade ihre maximale Inselzahl erreicht hatten. In gleicher Weise führte die Beschleunigung des Inselzyklus durch Promotoren dazu, daß zum letzten Zeitpunkt nach 18 Wochen die Inselzahlen der Kontrolltiere die der promovierten Tiere erreichten. Die Werte in dieser Übergangsphase sind also nur vor dem Hintergrund dieser Zusam-

menhänge interpretierbar. Deshalb legten wir bei der quantitativen Auswertung der Versuche die Werte der linearen Anstiegsphase zugrunde. Aus Untersuchungen von Kitagawa (1978) geht hervor, daß diese Werte mit der Tumorzahl korrelieren, somit liegt die Annahme nahe, daß eine vergleichbare Korrelation zwischen den Werten der Anstiegsphase und den Werten des Gleichgewichtszustands besteht. Zur Überprüfung dieser Hypothese wären Beobachtungen des Inselwachstums zu einem späteren Zeitpunkt von Interesse, zu dem die Inselzahl konstant bleibt.

4.3 Zur Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung von Carcinogenen und Promotoren

Alle uns vorliegenden Versuche bestätigen die universelle Gültigkeit der Druckrey'schen Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung $d \times t^n = \text{const.}$ für Carcinogene. Diese Beziehung gilt für die Tumorentstehung sowohl bei kontinuierlicher wie nach diskontinuierlicher Carcinogen-Applikation (s. Abb. 2). Die Gültigkeit dieser Formel für das Wachstum präcanzeröser enzymfreier Areale ist bisher nur bei kontinuierlicher Carcinogen-Zufuhr nachgewiesen worden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß diese Gesetzmäßigkeit auch nach Absetzen des Carcinogens gültig ist, sofern die Dosis nach Rajewsky umgerechnet wird.
Der Exponent n, von Druckrey "Verstärkerwirkung der Zeit" genannt, ist eine für das Carcinogen charakteristische Konstante, welche immer den gleichen Wert annimmt, unabhängig davon, welches Zielereignis für die Zeitmessung vorgegeben wird. Die Größe des Wertes k hingegen ist abhängig von dem Zielereignis. Mißt man die Zeit bis zum Tumortod, so ergibt sich ein hohes k, für die Zeit bis zum Auftreten der ersten tastbaren Tumoren ein entsprechend kleineres k, den kleinsten Wert nimmt k für das Wachstum präkanzeröser Inseln an. Dieser Wert k, der theoretisch der virtuellen Dosis entspricht, welche bereits zum Zeitpunkt der 1. Applikation das Zielereignis bewirkt (für $t = 1$ wird $d = k$), ist ein reziprokes Maß für die initiierende Aktivität eines Carcinogens.

n und k, Ausdruck zweier unabhängiger Wirkkomponenten des Carcinogens, liefern also wichtige Parameter zur differenzierten Risikobeurteilung krebserzeugender Stoffe. So sind Carcinogene mit hohem k und kleinem n schwach, mit kleinem k und großem n hingegen stark wirksam. Car-

cinogene, die durch hohes n und k charakterisiert sind, führen selbst in höchster Dosierung erst sehr spät zu Tumoren, geringere Dosierungen erfordern kaum eine längere Manifestationszeit,- die Zeit bis zur Tumorentstehung wird bei diesen Stoffen also kaum von der Carcinogen- Dosis beeinflußt. Im Gegensatz dazu rufen Carcinogene mit kleinem k und n in hohen Dosierungen bereits nach kurzer Zeit Tumoren hervor, während in geringer Dosierung erst sehr spät Neoplasmen auftreten.
Die Betrachtung präcanceröser Areale zeigt, welche zellulären Phänomene diesen unterschiedlichen Kinetiken zugrunde liegen. So entstanden bei unseren Versuchen nach der Gabe von DÄNA, einem Stoff mit einem n von 2,3 und kleinem k, sehr viele kleine Inseln. NNM hingegen, welches durch ein höheres n und ein höheres k charakterisiert ist, führte zu weniger Inseln, die erheblich größer waren (siehe Größenverteilungen im Ergebnisteil).
Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, daß n, die Verstärkerwirkung der Zeit, ein Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit präcanceröser Zellen ist. Wenn dies der Fall wäre, so müßten Promotoren, welche ihre Wirkung aufgrund einer Steigerung der Proliferationsrate ausüben, bei Zufuhr im Anschluß an eine Carcinogen- Applikation eine Erhöhung von n bewirken. Dies läßt sich in der Tat aus den Arbeiten von Stenbäck, Shubik und Peto ableiten, die die Wirkung des klassischen Promotors TPA im Anschluß an die Behandlung mit verschiedenen Dosen des Carcinogens DMBA untersuchten (Stenbäck et al., 1981). Rechnet man die Dosen, wie im Ergebnisteil gezeigt, auf die Zeit bis zur Tumormanifestation um und trägt sie im doppelt logarithmischen Netz auf, so zeigt sich, daß die Dosis- Zeit- Wirkungskurve durch den Promotor einen steileren Verlauf erhält, n also größer wird (s. Abb. 34).

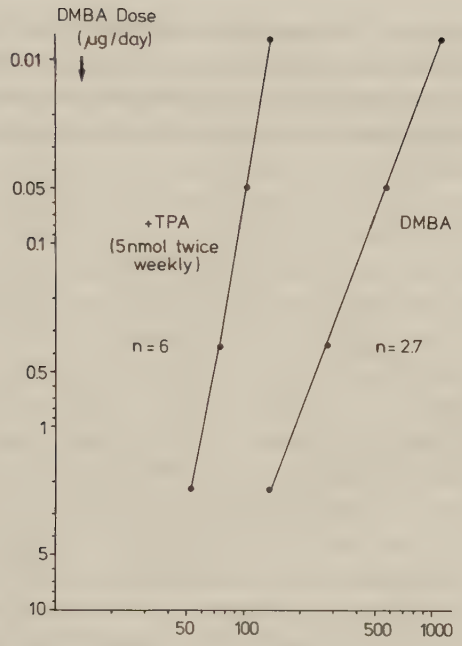


Abb. 34: Einfluß einer konstanten TPA- Dosis auf die Entstehung von Hauttumoren. Initiation mit steigenden Dosen DMBA. Zielgröße: 25% mit Tumoren befallene Mäuse. Daten: Stenbäck et al. (1981)

Unsere Beobachtung, daß Phenobarbital-Applikation sich in der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung durch eine Erhöhung von n äußert, liefert also einen weiteren Hinweis darauf, daß seine Wirkung auf promovierenden Eigenschaften beruht.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, ist von einem Promotor außerdem zu erwarten, daß er einen Schwellenwert besitzt und seine maximale Wirkung begrenzt ist. Somit ist anzunehmen, daß die Dosis-Zeit-Wirkungskurve einen S-förmigen Verlauf hat. Für die Richtigkeit dieser Annahme spricht die Analyse der Dosis-Zeit-Wirkungs-Kurve des klas-

sischen Promotors TPA aufgrund von Daten von Hecker (1981). Hier zeigt sich, daß in hohen Dosisbereichen keine Wirkungssteigerung durch Dosiserhöhung mehr zu erreichen ist, die Kurve sich also asymptotisch der Maximalwirkung annähert (s. Abb. 35a).

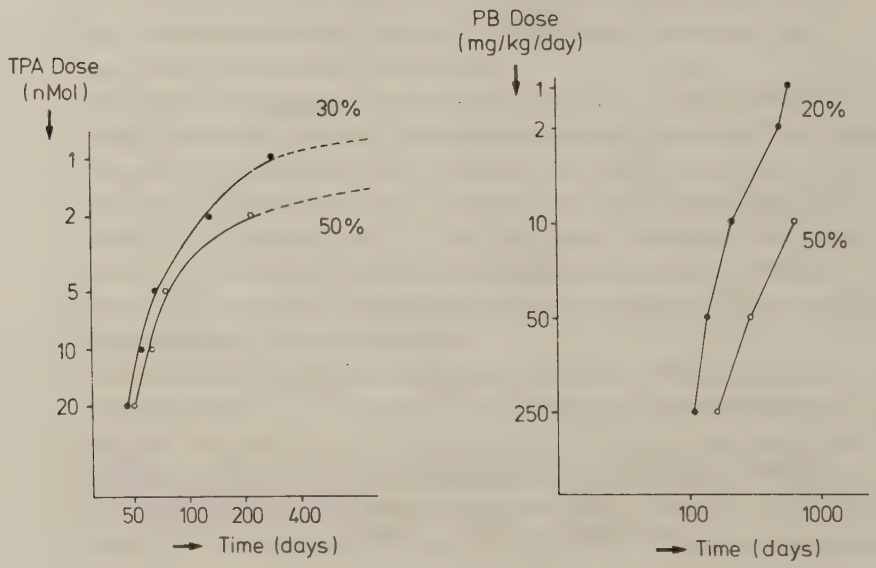


Abb. 35: Dosis- Zeit- Wirkungsbeziehungen. Zielgröße: definierter Prozentsatz tumortragender Tiere

a: Von TPA bei Hauttumoren MBA- initiierter Mäuse Daten: Hecker et al. 81

b: Von Phenob.bei Lebertum. 2-AAF- initiierter Mäuse Daten: Peraino et al. 81

Einen vollkommen identischen Kurvenverlauf lieferten die Daten von Boutwell und Slaga (1974).
Einen Hinweis darauf, daß sich bei Phenobarbital ein entsprechender Verlauf ergibt, brachte die Auswertung der Daten von Peraino (1981) (s. Abb. 35b).

Die eigenen Versuche mit Phenobarbital in drei verschiedenen Dosierungen im Anschluß an NNM-Initiation zeigten eine Dosis-Zeit-Wirkungs-Kurve mit einem ähnlichen Verlauf, allerdings einer weniger ausgeprägten Krümmung. Überraschenderweise konnte auch noch in der kleinsten Dosierung eine Erhöhung der Inselfläche erzielt werden. Dieses für uns unerwartete Resultat wird dadurch verständlich, daß wir die Auswahl der Dosierungen nach den metabolischen Auswirkungen in erwachsenen Tieren getroffen hatten. Aufgrund der größeren Empfindlichkeit von Jungtieren für Phenobarbital ist die Wirkung in niedrigen Dosierungen erklärbar. Aus dem in Abb. 31 dargestellten Verlauf der Dosis-Zeit- Wirkungskurve läßt sich ebenfalls nicht entnehmen, ob in einer Dosierung von 75 mg/kg die maximale Wirkung erzielt wird. Um ein genaueres Bild des Verlaufs der Dosis-Zeit- Wirkungskurve zu erhalten, müßte deshalb die Wirkung von Phenobarbital unterhalb einer Dosierung von 0,75 und oberhalb von 75 mg/kg KG untersucht werden. Um den kurvenförmigen Verlauf besser darstellen zu können, müßten außerdem verschiedene Dosierungen in der Größenordnung von 75 mg/kg appliziert werden, wo der Scheitelpunkt der Kurve zu erwarten ist. Ein weiterer Grund für den annähernd linearen Verlauf des Graphen ist in der geringen promovierenden Wirkung von Phenobarbital in diesem Versuch zu sehen. Deutlicher müßte sich der kurvenförmige Verlauf zeigen, wenn mit einer kleineren initialen Carcinogen-Dosis vorbehandelt wird, da das Ausmaß der promovierenden Wirkung umgekehrt proportional der Höhe der Initiationsdosis ist, wie sich in unseren Versuchen zeigte.

Eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung promovierender und syncarcinogener Wirkung müßte sich mit Hilfe der mathematischen Erfassung der unterschiedlichen Kur-

venverläufe ergeben. Ausgehend von der Beziehung $d \times t^n = \text{const.}$ müßte sich die Wirkung von Syncarcinogenen nach folgender Formel addieren:

$$(d_{konst} + d_{var}) \times t^n = \text{const.}$$

Promotoren hingegen bewirken eine dosisabhängige Steigerung von n:

$$d_{konst} \times t^{n+f(\text{Promotordosis})} = \text{const.}$$

f (Promotordosis), die Erhöhung von n durch den Promotor, sollte mit steigender Dosis zunehmen.
Die experimentelle Überprüfung dieser Hypothese und Bestimmung der entsprechenden Größen, wäre ein Weg, die promovierende Wirkung auch mathematisch zu erfassen, und so letztlich Syn- und Cocarcinogenese zu differenzieren.

Auch wenn durch derartige Untersuchungen die Erhöhung der Tumorinzidenz durch Pharmaka auf eine promovierende Wirkung zurückgeführt werden kann, ist damit jedoch noch nicht die Unbedenklichkeit der therapeutischen Anwendung dieser Arzneimittel erwiesen. Eine Beurteilung des Risikos für den Menschen ist nur möglich durch Beantwortung der Frage, ob die zur Promotion führende biologische Wirkung bereits in therapeutischen Dosisbereichen erzielt wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Eine große Zahl von Arzneimitteln und Umweltfremdstoffen führt bei chronischer Einwirkung hoher Dosen zu einer hyperfunktionellen Lebervergrößerung. Bei bestimmten Mäuse- und Rattenstämmen wird dadurch die Inzidenz von Lebertumoren signifikant erhöht. Ziel dieser Arbeit war, am Beispiel von Phenobarbital zu untersuchen, ob die Erhöhung der Tumorrate auf einer carcinogenen Wirkung dieser Stoffe oder auf einer Promotion schon initiierter Zellen beruht. Als für die Beurteilung geeignete Methode wurden Frequenz und Wachstumsverlauf präcanceröser ATPase-defizienter Zellareale nach isolierter und sequentieller Applikation von Nitrosaminen und Phenobarbital untersucht, sowie Analysen der Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen durchgeführt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Nach Abschluß der Behandlung adulter weiblicher SD-Ratten mit Diäthylnitrosamin steigt die Zahl der ATPase-freien Inseln weiter an und erreicht erst nach etwa 12 Wochen ihren maximalen Wert. Sie fällt danach wieder ab und erreicht bei längerer Beobachtungszeit ein konstant bleibendes Plateau (Inselzyklus). Aus der Größenverteilung der Inseln ergibt sich, daß nach Erreichen des Maximums keine neuen kleinen Inseln mehr entstehen. Die Gesamtinselfläche nimmt jedoch aufgrund des Wachstums der Einzelareale weiter zu.

2. Der zeitliche Ablauf dieses Inselzyklus ist abhängig von der Dosis des initiierenden Carcinogens. Nach Applikation hoher Tagesdosen wird das hohe Maximum der Inselzahl früher erreicht als die niedriger liegenden Maximalwerte bei kleineren Dosen. Es wird angenommen, daß dafür die konzentrationsabhängige proliferations-

steigernde Wirkung des Carcinogens verantwortlich ist.

3. Auch nach zeitlich limitierter DÄNA-Applikation gilt für das Ausmaß präneoplastischer Veränderungen die Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehung $d \times t^n = const.$.

4. Phenobarbitalbehandlung im Anschluß an die initiierende DÄNA-Applikation führt zu einem steileren Anstieg der Inselzahl; das Maximum liegt höher als bei der Kontrolle und wird früher erreicht, die Inselzahl fällt anschließend ebenfalls wieder ab. Auch bei Fortdauer der Phenobarbitalzufuhr entstehen nach Erreichen des Maximums keine neuen Inseln mehr. Damit übereinstimmend treten bei Beginn der Phenobarbitalnachbehandlung zu diesem Zeitpunkt keine neuen kleinen Inseln auf.

5. Entsprechend der Beschleunigung des Zeitablaufs der Inselentwicklung finden sich bei Phenobarbitalbehandlung früher schnell proliferierende Inseln mit weiter fortgeschrittenen neoplastischen Zellcharakteristika. Es finden sich verdrängend wachsende neoplastische Knoten, die bei alleiniger Nitrosaminapplikation zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten sind.

6. Das Ausmaß der Phenobarbitalwirkung ist abhängig von der proliferationssteigernden Wirkung des vorher applizierten Carcinogens. Sie ist nach hoher initialer DÄNA-Dosis geringer als nach kleineren Dosen. Phenobarbital bewirkt somit einen steileren Anstieg der Dosis-Zeit-Wirkungskurve, führt also zu einer Erhöhung des Zeitverstärkerfaktors n.

7. Wiederholte Auslösung von Leberproliferation durch intermittierende Phenobarbitalbehandlung hat trotz niedriger Gesamtdosis zumindest eine gleich starke Wirkung wie kontinuierliche Applikation mit erheblich höheren Gesamtdosen. Es besteht deshalb nicht wie bei Carcinogenen eine Abhängigkeit von der Gesamtdosis, sondern

von der zellbiologischen Initialwirkung der Proliferationsstimulation.

8. Phenobarbitalzufuhr ohne vorausgegangene Nitrosamin-Initiation hat keine Erhöhung von Inselzahl und Inselfläche zur Folge.

9. Nach 7-wöchiger N-Nitrosomorpholin-Applikation bewirkt Nachbehandlung mit Phenobarbital in den Dosierungen von 0.75, 7.5 und 75 mg/kg Tiergewicht nach 18 Wochen eine dosisabhängige Steigerung der Inselfläche; nur durch die höchste Dosierung von 75 mg wird gleichzeitig die Inselzahl erhöht.

10. Alle zu diesem Zeitpunkt bestehenden ATPase-freien Inseln weisen eine erhöhte γ- GT-Aktivität auf. Die Erhöhung ist jedoch oft nur herdförmig in Teilbereichen der Insel nachweisbar. Dieses Enzym ist somit ein ungeeigneter Marker für quantitative Analysen von Zahl und Fläche präneoplastischer Areale, sondern eignet sich nur zur qualitativen Beurteilung der Proliferationsintensität einzelner Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen es wahrscheinlich, daß die Erhöhung der Inzidenz von Lebertumoren durch Phenobarbital nicht auf einer carcinogenen Eigenwirkung beruht, sondern auf der Promotion initiierter Zellen, die durch Verkürzung des Zeitablaufs zu einer früheren Manifestation präneoplastischer und neoplastischer Areale führt. Die zellbiologischen Grundlagen dieser Wirkung wurden diskutiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Appel, K.E., Rickart, R., and Kunz, W. (1979): Influences of inducers and inhibitors of the microsomal mono-oxygenase system on the alkylating intensity of dimethylnitrosamine in mice. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 94: 47-61.

2. Bannasch, P. (1968): The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis. Rec. Res. Cancer Research, 19, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

3. Berenblum, I. (1941): The cocarcinogenic action of Croton resin. Cancer Res., 1: 44-48.

4. Berenblum, I., and Shubik, P. (1947): The role of croton oil application associated with a single pointing of a carcinogen, in tumour induction of the Mouse's skin. Brit. J. Cancer, 1: 379-382.

5. Böhm, N., Noltemeyer, N. (1981): Development of Binuclearity and DNA-Polyploidization in the Growing Mouse Liver. Histochemistry, 72: 55-61.

6. Böhm, N., and Noltemeyer, N. (1981): Excessive Reversible Phenobarbital Induced Nuclear DNA-Polyploidization in the Growing Mouse Liver. Histochemistry, 72: 63-74.

7. Boutwell, R.K. (1974): The function and mechanism of promotors of carcinogenesis. Crit. Rev. Toxicol. 2: 419-443.

8. Cairns, J. (1981): The Origin of Human Cancer. Nature, 289: 353-357.

9. Clemmesen, J. (1974): Are anticonvulsants oncogenic? Lancet, 705-707.

10. Clemmesen, J., Hjalgrim-Jensen, S. (1978): Is phenobarbital carcinogenic? A follow-up of 8078 epileptics. Ecotoxicology and environmental safety, 1: 457-470.

11. Conney, A.H. (1967): Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. Pharmacol. Rev., 19: 317-366.

12. Druckrey, H., Küpfmüller, K. (1948): Quantitative Analyse der Krebsentstehung. Zeitschrift für Naturforschung, 3b: 254-266.

13. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivonkovic, S., und Schmähl, D. (1967): Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch., 69: 103-201.

14. Druckrey, H. (1967): Quantitative Aspects in Chemical Carcinogenesis. U.I.C.C. Monographs, 7: 60-78.

15. Emmelot, P., and Scherer, E. (1980): The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis: a quantitative approach. Biochim. Biophys. Acta, 605: 247-304.

16. Fiala, S., Fiala, A.E., and Dixon, B. (1972): γ-Glutamyl transpeptidase in transplantable, chemically induced rat hepatomas and "spontaneous" mouse hepatomas. J. Natl. Cancer Inst., 48: 1393-1401.

17. Friedrich-Freksa, H., Gössner, W., and Börner, P. (1969): Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch., 72: 226-253.

18. Friedrich-Freksa, H., Paradopulu, G., and Gössner, W. (1969): Histochemische Untersuchungen der Carcinogenese in der Rattenleber nach zeitlich begrenzter Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch., 72: 240-253.

19. Golberg, L. (1966): Liver enlargement produced by drugs: its significance. In: Experimental Study of the Effects of Drugs on the Liver, pp. 171-184. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam International Congress Series No. 115.

20. Hecker, E. (1971): Isolation and characterization of the cocarcinogenic principles from croton oil. In: Methods in Cancer Research, edited by H. Busch, 6: 439-484. Academic Press, New York/London.

21. Hecker, E., and Schmidt, R. (1981): personal communication.

22. Jones, G., and Butler, W.H. (1975): Morphology of spontaneous and induced neoplasia. In: Mouse Hepatic Neoplasia. Eds. W.H. Butler and P.M. Newberne. Elsevier, Amsterdam/Oxford/New York, p. 21-60.

23. Kinsella, A.R., and Radman, M.G. (1978): Tumor promotor induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanisms of carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 6149-6153.

24. Kitagawa, T., Sugano, H. (1978) : Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme- altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl- 4-(dimethylamino)- azobenzene or dimethylnitrosamine. Gann , 69: 679- 687

25. Kunz, W., Schaude, W., and Siess, M. (1966): Stimulation of liver growth by drugs. In: Proceedings of the European Society for the study of drug toxicity, VII: pp. 113-153. International congress series No. 115, Amsterdam: Excerpta Medica.

26. Kunz, W., Schaude, G., and Thomas, C. (1969): Die Beeinflussung der Nitrosamincarcinogenese durch Phenobarbital und Halogenkohlenwasserstoffe. Z. Krebsforsch., 72: 291-304.

27. Kunz, W., Appel, K.G., Schwarz, M., and Stöckle, G. (1978): Enhancement and inhibition of carcinogenic effectiveness of nitrosamines. In: Primary liver tumours, edited by H. Remmer, H.M. Bolt, P. Bannasch, H. Popper, pp. 261-284. MTP Press, Lancaster, U.K.

28. Kunz, W., Schaude, G., Schwarz, M., and Tennekes, H. (1982): Quantitative Aspects of Drug-mediated Tumour Promotion in Liver and its Toxicological Implications. In: Carcinogenesis, Vol. 7, Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promoters (Hecker, E. et al. eds), Raven Press, New York.

29. Lojda, Z., Gossrau, R., and Schiebler, T.H. (1976): Enzymhistochemische Methoden, pp. 182-184, Springer, Heidelberg.

30. Masahito, P., Takayama, S., and Yamada, K. (1976): Early cytological changes induced in rat liver cells by chemicals. In: Fundamentals in Cancer Prevention, edited by P.N. Magee, pp. 103-111. Univ. of Tokyo Press, Tokyo.

31. Morris, H.P. (1963): Some Growth, Morphological and Biochemical Characteristics of Hepatoma S 123 and other New Transplantable Hepatomas. Progr. Experimental Tumour Research, 3: 370-411.

32. Orlowski, M., and Meister, A. (1970): The γ-glutamyl cycle: A possible transport system for amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 57: 1248-1255.

33. Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E. (1971): Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res., 31: 1506-1512.

34. Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E., and Kisieleski, W.E. (1973): Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Cancer Res., 33: 2701-2705.

35. Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E. (1973): Enhancement of spontaneous hepatic tumorigenesis in C3H mice by dietary phenobarbital. J. Natl. Cancer Inst., 51: 1349-1350.

36. Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E., and Christopher, J.P. (1975): Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichlorodiphenyltrichloroethane on 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat. Cancer Res., 35: 2884-2890.

37. Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E. (1977): Effects of varying the onset and duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. Cancer Res., 37: 3623-3627.

38. Peraino, C., Fry, R.J.M., and Grube, D.D. (1978): Drug-induced enhancement of hepatic tumorigenesis. In: Mechanisms of Tumor Promotion and Cocarcinogenesis, edited by T.J. Slaga, A. Sivak, and R.K. Boutwell, 2: 421-432, Raven Press, New York.

39. Peraino, C., Staffeldt, E.F., Haugen, D.S., Lombard, L.S., Stevens, F.J., and Fry, R.J.M. (198o): Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis. Cancer Res., 4O: 3268-3273.

4O. Pitot, H.C. (1966): Some Biochemical Aspects of Malignancy. Annual Revue Biol., 35: 335.

41. Pitot, H.C., Borsness, L., Goldsworthy, T., and Kitagawa, T. (1978): Biochemical characterization of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. Nature 271: 456-458.

42. Port, R. (1981): Multi-Hit Model Describing the Induction of ATP'ase Deficient Cell Clones in Rat Liver by Carcinogens. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 99: A4O.

43. Port, R., Stöckle, G., Tennekes, K., and Kunz, W. (1981): Dose-time relations in the induction of enzyme-deficient cell islets and malignant tumors in rat liver by N-nitrosomorpholine. (in press.)

44. Rabes, H.M., Scholz, P., and Jantsch, B. (1972: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. Cancer Res., 32: 2577-2586.

45. Radman, M., Jeggo, P., and Wagner, R. (1981): Chromosomal Rearrangements and Carcinogenesis. in press Nature.

46. Rajewsky, M.F., Dauber, W., and Frankenberg, H. (1966): Liver carcinogenesis by diethylnitrosamine in the rat. Science, 152: 83-85.

47. Rajewsky, M.F. (1972): Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumor growth and carcinogenesis. Z. Krebsforsch., 78: 12-30.

48. Rappaport, A.M., Borowy, Z.J., Lougheed, W.M., and Lotto, W. N. (1963): Anatom. Rec. 119, 16 (1954); The Liver I, Academic Press, New York, London. p. 265.

49. Remmer, H. (1959): Der beschleunigte Abbau von Pharmaka unter dem Einfluß von Luminal. Arch. exp. Path. Pharmakol., 235: 279.

50. Remmer, H. (1962): Drug tolerance. In: CIBA Foundation Symp. on Enzymes and Drug Action, p. 276, London.

51. Remmer, H. und Merker, H.J. (1963): Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem Retikulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital. Klin. Wochenschrift, 41: 276-282.

52. Remmer, H. (1964): Drug-induced formation of the smooth endoplasmatic reticulum and of drug metabolizing enzymes. Proceed. of the Europ. Sec. f. the study of drug toxicity, 4: 57.

53. Remmer, H. and Merker, H.J. (1965): Effect of drugs on the formation of smooth endoplasmatic reticulum and drug metabolizing enzymes. Ann. N.Y. Acad. Sci. , 123: 79.

54. Remmer, H. (1972): Induction of drug metabolizing enzyme systems in the liver. Europ. J. Clin. Pharmacol., 5: 116-136.

55. Rossi, L., Ravera, M., Repetti, G., and Santi, L. (1977): Long-term administration of DDT or phenobarbital-Na in Wistar rats. Int. J. Cancer, 19: 179-185.

56. Schauer, H., and Kunze, E. (1968): Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforsch., 70: 252-266.

57. Scherer, E., Friedrich-Freksa, H. (1970): Zur Zentralvene gerichtete Wanderung von Leberzellen der Ratte nach partieller Hepatektomie und nach Verabfolgung von Diäthylnitrosamin. Z. Naturforsch., 25b: 637-642.

58. Scherer, E., Hoffmann, P., Emmelot, P., and Friedrich-Freksa, H. (1972): Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy. J. Natl. Cancer Inst., 49: 93-106.

59. Scherer, E., and Emmelot, P. (1975): Foci of altered liver cells induced by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy: their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat. Europ. J. Cancer, 11: 145-154.

60. Schieferstein, G., Pirschel, S., Frank, W., Friedrich-Freksa, H. (1974): Quantitative Untersuchungen über den irreversiblen Verlust zweier Enzymaktivitäten in der Rattenleber nach Verfütterung von Diäthylnitrosamin. Z. Krebsforschung, 82: 191-208.

61. Schulte-Hermann, R. (1974): Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli. Crit. Rev. Toxicol., 3: 97-158.

62. Schwarz, M., Appel, K.E., Rickart, R., and Kunz, H.W. (1979): Effect of DMN, phenobarbital and halothane on the sedimentation characteristics of rat liver DNA. In: Mechanisms of Toxic action on some target organs. Arch. Toxicol., Suppl. 2: 479-482.

63. Slaga, T.J., Bowden, G.T., Scribner, J.D., Boutwell, R.K. (1974): Dose-Response Studies on Ability of 7, 12-Dimethyl Benzanthracene and Benzanthracene to Initiate Skin Tumors. J. Nat. Canc. Inst., 53: 1337-1340.

64. Solt, D., and Farber, E. (1976): New principle for analysis of chemical carcinogenesis. Nature, 263: 701-703.

65. Stenbäck, F., Peto, R., and Shubik, P. (1981): Initiation and Promotion at Different Ages and Doses in 2200 Mice. Br. J. Cancer, 44: 1-34.

67. Stevens, F.J., and Peraino, C. (1981): Development of a model to simulate the characteristics of rat liver tumor promotion by phenobarbital in Cocarcinogenesis and Biological Effects of Tumor Promotors (Ed. E. Hecker), 7: Raven Press, New York.

67. Stöckle, G. (1979): Morphometrische Analysen präneoplastischer Zellareale zur Frühbeurteilung der hepatocarcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin und deren Beeinflussung durch Fremdstoffe. Inaugural-Dissertation Medizinische Fakultät Tübingen.

68 Swenberg, J.A., Petzold, G. L., and Horbach, P. R. (1976): In vitro DNA damage/alkaline elution assay for predicting carcinogenic potential. Biophys. Biochem. Res. Commun., 72: 732-738

69 Tennekes, H. A., Wright, A. S., Dix, K. M., and Koeman, J. H. (1981): The effects of dieldrin, diet and bedding on enzyme function and tumour incidence in livers of male CF-1 mice. Cancer Research (accepted for publication).

70 Thorpe, E., Walker, A.I.T. (1973): The toxicology of Dieldrin (HEOD). II. Comparative long-term oral toxicity studies in mice with Dieldrin, DDT, Phenobarbitone, β-BHC and γ-BHC. Fd. Cosmet. Toxicol., 11: 433-442

71 Tomatis, L., Turosov, V., Day, N., and Charles, R.T. (1972): The effects of long-term exposure to DDT on CF-1-mice. Int J. Cancer, 10: 489-506

72 Wachstein, M., Meisel, E., Niedwiedz (1960): Histochemical demonstration of the mitochondrial adenosine triphosphatase with the lead- adenosine triphosphatase technique. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 8, 387-388

73 Walker, A. I. T., Thorpe, E., Stevenson, D. E. (1973) The toxicology of dieldrin (HEOD). I. Long term oral toxicity studies on mice. Food Cosm. Toxicol., 11: 415-432

74 Weibel, E. R., Gomez, D. M. (1962) A Principle for Counting Tissue Structures on Random Sections. Journal of Applied Physiology, 342-348

75 Weibel, E. R. (1979) Stereological Methods for Biological Morphometry, Academic Press

Tab. 1 : 4- wöchige Behandlung mit 6 mg/kg KG DÄNA im Trinkwasser Nachbehandlung : Wasser (D) , kontinuierliche Applikation von Phenobarbital (DPk) , Clofibrat (DCl) , Trifluoressigsäure (DTr) und intermittierende einwöchige Applikation von Phenobarbital in Intervallen von 6 Wochen (DPi). Untersuchungstermine : sofort, 6, 12, 18 Wochen nach Ende der DÄNA- Behandlung.

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
to	D_1	o,46	o,oo2	4,4
	D_2	o,3o	o,oo1	3,2
	D_3	3,63	o,o48	13,2
	D_4	1,16	o,o15	12,8
	D_5	o,49	o,oo5	1o,6
	M	1,21	o,o14	8,8
	SD	1,39	o,o2o	4,7
t6	D_1	4,99	o,o76	15,2o
	D_2	16,o2	o,436	27,25
	D_3	1,6o	o,o47	29,43
	D_4	1,39	o,o19	13,4o
	D_5	7,72	o,21o	27,2o
	M	6,34	o,158	22,5o
	SD	6,o1	o,172	7,56

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t12	D_1	27,37	o,382	13,96
	D_2	49,6o	1,o37	2o,91
	D_3	64,97	2,156	33,19
	D_4	33,37	o,686	2o,56
	D_5	56,73	1,6o9	28,36
	M	46,41	1,174	23,4o
	SD	15,76	o,714	7,48
t18	D_1	19,84	o,291	14,69
	D_2	34,38	o,884	25,71
	D_3	52,99	1,564	29,51
	D_4	12,29	o,141	11,47
	D_5	siehe Verteilungen		
	M	29,88	o,72o	2o,35
	SD	17,93	o,648	8,63

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	DPk_1	4,75	o,o86	18,o4
	DPk_2	31,41	o,613	19,51
	Dpk_3	6,69	o,o95	14,18
	DPk_4	32,89	o,897	27,28
	DPk_5	18,17	o,326	17,94
	M	18,79	o,4o3	19,39
	SD	13,25	o,35o	4,83
t12	DPk_1	1o,94	o,1oo	9,16
	DPk_2	22,46	o,735	32,73
	DPk_3	81,o3	1,8o8	22,31
	DPk_4	42,56	o,973	22,85
	DPk_5	37,31	1,298	34,78
	M	38,86	o,983	24,37
	SD	22,66	o,637	1o,2o
t18	DPk_1	27,45	o,562	2o,49
	DPk_2	3o,93	o,92o	29,74
	DPk_3	22,51	o,532	23,64
	DPk_4	12,57	o,265	21,o1
	DPk_5	33,55	2,199	65,55
	M	25,4o	o,896	32,o9
	SD	8,28	o,765	19,o6

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	DPi 1	26,98	0,560	20,76
	DPi 2	32,12	0,626	19,49
	DPi 3	7,79	0,059	7,58
	DPi 4	22,45	0,348	15,53
	DPi 5	12,26	0,236	19,24
	M	20,32	0,366	16,52
	SD	10,13	0,233	5,36
t12	DPi 1	18,17	0,484	26,63
	DPi 2	20,18	0,338	16,75
	DPi 3	30,40	0,603	19,83
	DPi 4	52,80	0,980	18,57
	DPi 5	115,33	4,035	34,99
	M	47,38	1,288	23,35
	SD	40,40	1,554	7,50
t18	DPi 1	18,16	0,253	13,94
	DPi 2	13,66	0,187	13,66
	DPi 3	24,97	0,441	17,66
	DPi 4	88,60	2,749	31,02
	DPi 5	51,52	2,023	39,28
	M	39,38	1,131	23,11
	SD	31,18	1,178	11,48

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	DCl 1	39,34	o,781	19,85
	DCl 2	12,15	o,129	1o,59
	DCl 3	15,21	o,15o	9,84
	DCl 4	23,42	o,315	13,45
	DCl 5	44,19	o,692	15,65
	M	26,86	o,413	13,88
	SD	14,32	o,3o5	4,o7
t12	DCl 1	27,94	o,329	11,78
	DCl 2	78,96	1,88o	23,81
	DCl 3	26,o7	o,322	12,34
	DCl 4	26,72	o,368	13,8o
	DCl 5	28,27	o,449	15,88
	M	37,59	o,67o	15,52
	SD	23,14	o,678	4,9o
t18	DCl 1	29,42	o,6o4	2o,52
	DCl 2	29,34	o,81o	27,6o
	DCl 3	37,o3	1,174	31,71
	DCl 4	35,1o	1,255	35,77
	DCl 5	17,27	o,395	22,9o
	M	29,66	o,848	27,7o
	SD	7,74	o,367	6,24

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	DTr_1	15,85	o,4o2	25,39
	DTr_2	4,22	o,o54	12,9o
	DTr_3	5,98	o,o98	16,47
	DTr_4	34,18	o,544	15,94
	DTr_5	61,27	o,928	15,15
	M	24,3o	o,4o5	17,17
	SD	23,85	o,357	4,79
t12	DTr 1	5,87	o,o45	7,71
	DTr_2	12,48	o,147	11,74
	DTr_3	79,89	2,89o	36,18
	DTr_4	5,19	o,o54	1o,5o
	DTr_5	15,61	o,166	1o,6o
	M	23,81	o,66o	15,35
	SD	31,66	1,248	11,74
t18	DTr_1	27,77	o,771	27,76
	DTr_2	47,86	1,375	28,72
	DTr_3	3o,76	1,o35	33,65
	DTr_4	7,79	o,6oo	77,1o
	DTr_5	21,o1	o,689	32,81
	M	27,o4	o,894	4o,o1
	SD	14,62	o,314	2o,89

Größenverteilungen : Nachbehandlung Wasser (D)

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3				
	to	t6	t12	t18	Tier 5, t18
5o,7	/	/	/	/	166,3
72,o	23,4	3,6	371,4	227,o	648,6
1o2	39,9	89,8	831,o	616,3	1814,1
145	26,5	136,o	939,7	687,4	21o5,5
2o7	6,o	97,1	586,8	357,4	1586,3
294	5,4	42,5	223,7	16o,5	1o32,2
417	/	14,7	94,2	61,1	41o,3
593	/	o,44	22,4	9,3	141,8
842	/	/	2,2	1,7	32,2
119o	/	/	/	/	16,1
169o	/	/	/	/	o,89
Summe	1o1,2	384	3o71	212o	7954

Nachbehandlung Phenobarbital, kontinuierlich (DPk)

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7	/	/	/	/
72,o	23,4	73,8	368,3	175,o
1o2	39,9	368,6	987,4	6o4,5
145	26,5	432,5	719,4	483,8
2o7	6,o	268,4	4o4,4	298,7
294	5,4	1oo,o	144,8	1o6,3
417		21,9	51,9	44,7
593		1,8	13,o	14,9
842		o,4	1,3	2,6
119o		o,1	o,1	1,5
169o		o,1	o,6	1,1
Summe	1o1,2	1267	2691,1	1733,2

Tier D_5 , t 18 hatte ein relatives Lebergewicht von 45 g/ kg im Verhältnis zu 35 $\pm$ 4 g/ kg bei den übrigen Tieren . Da diese Erhöhung auf einen massiven Tumorbefall der Leber zurückzuführen ist, wurde dieses Tier getrennt aufgeführt.

Größenverteilungen : Nachbehandlung Phenobarb. intermittierend (DPi)

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7				
72,o	23,4	229,6	452,2	237,2
1o2	39,9	587,7	915,2	736,4
145	26,5	42o,o	921,9	829,2
2o7	6,o	223,2	582,2	448,3
294	5,4	71,4	215,1	216,1
417		25,7	86,9	66,o
593		3,7	24,7	22,1
842			4,5	3,4
119o			o,5	o,6
169o				
Summe	1o1,2	1562	32o3,2	2559,3

Nachbehandlung Clofibrat (DCl)

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7			34,5	
72	23,4	81,9	6o9,o	134,8
1o2	39,9	764,1	996,1	524,9
145	26,5	686,7	753,6	582,5
2o7	6,o	26o,o	326,6	368,4
294	5,4	88,3	119,6	184,6
417		14,1	42,8	5o,4
593		1,3	8,3	14,o
842			o,6	1,1
119o		o,3	o,2	1,o
169o				
Summe	1o1,2	1897	2891	1862

Größenverteilungen : Nachbehandlung Trifluoressigsäure (DTr)

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7				
72	23,4	189,3	494,1	124,9
1o2	39,9	547,5	762,1	556,6
145	26,5	564,6	563,3	512,6
2o7	6,o	289,9	269,9	263,1
294	5,4	1o6,o	156,7	146,9
417		17,1	53,1	6o,o
593		1,9	28,o	11,o
842			3,5	4,1
119o			o,6	o,4
169o				o,4
Summe	1o1,2	1714	2331	168o

Tab. 2 : 18 tägige Behandlung mit 2, 4 und 8 mg/kg KG DÄNA per Schlundsonde. Anschlußbehandlung : Wasser (D2, D4, D8, je nach Vorbehandlung) , Phenobarbital (DP2, DP4, DP8) und 5 Wochen Phenobarbital im Anschluß an 12 Wochen Wasser (D2P5, D4P5, D8P5). Untersuchungstermine : sofort, 6, 12 und 18 Wochen nach Ende der DÄNA Behandlung.

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
to	$D2_1$	1,33	0,0049	3,7
	$D2_2$	1,35	0,0020	1,5
	$D2_3$	1,33	0,0045	3,4
	$D2_4$	0,59	0,0012	2,0
	$D2_5$	0,89	0,0017	1,9
	M	1,10	0,0029	2,5
	SD	0,34	0,0017	1,0
to	$D4_1$	0,15	0,0001	0,8
	$D4_2$	0,30	0,0009	2,9
	$D4_3$	1,64	0,0036	2,2
	$D4_4$	1,11	0,0019	1,7
	$D4_5$	1,78	0,0206	11,6
	M	1,00	0,0054	3,8
	SD	0,75	0,0086	4,4

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
to	D8 1	2,13	0,0070	3,3
	D8 2	2,22	0,0092	4,1
	D8 3	2,52	0,0015	0,6
	D8 4	0,51	0,0029	5,7
	D8 5	0,30	0,0007	2,5
	M	1,54	0,0043	3,2
	SD	1,05	0,0037	1,9

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$
t6	$D2_1$	5,74	o,o22	3,6
	$D2_2$	o,79	o,o13	17,o
	$D2_3$	o,46	o,oo9	2,o
	$D2_4$	o,77	o,oo2	2,8
	$D2_5$	1,68	o,oo8	4,6
	M	1,89	o,o11	6,1
	SD	2,2o	o,oo8	6,2
t12	$D2_1$	o,89	o,o17	19,5
	$D2_2$	2,79	o,o14	4,9
	$D2_3$	1,99	o,oo9	4,4
	$D2_4$	12,43	o,o83	6,7
	$D2_5$	4,83	o,o16	3,4
	M	4,59	o,o28	7,8
	SD	4,62	o,o31	6,7
t18	$D2_1$	1,78	o,o13	7,4
	$D2_2$	7,48	o,1o2	13,6
	$D2_3$	7,85	o,o89	11,3
	$D2_4$	7,82	o,1o1	13,o
	$D2_5$	9,93	o,1o7	1o,8
	M	6,97	o,o82	11,2
	SD	3,o6	o,o39	2,4

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	$D4_1$	6,61	0,053	8,1
	$D4_2$	9,55	0,045	4,7
	$D4_3$	9,65	0,042	4,4
	$D4_4$	6,27	0,027	4,3
	$D4_5$	3,00	0,008	2,7
	M	7,02	0,035	4,8
	SD	2,75	0,018	2,0
t12	$D4_1$	10,63	0,062	5,8
	$D4_2$	11,01	0,060	5,5
	$D4_3$	18,02	0,076	4,2
	$D4_4$	12,57	0,078	6,2
	$D4_5$	9,85	0,042	4,3
	M	12,41	0,064	5,2
	SD	3,29	0,015	0,9
t18	$D4_1$	15,30	0,156	10,2
	$D4_2$	7,15	0,075	10,5
	$D4_3$	6,96	0,079	11,3
	$D4_4$	8,00	0,079	9,9
	$D4_5$	7,70	0,041	5,3
	M	9,02	0,086	9,4
	SD	2,32	0,042	2,4

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm ^{2}	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	$D8_1$	4,79	o,o51	1o,3
	$D8_2$	7,48	o,o24	3,2
	$D8_3$	13,o7	o,147	11,3
	$D8_4$	14,14	o,179	12,2
	$D8_5$	14,22	o,1o7	7,5
	M	1o,78	o,1o2	8,9
	SD	4,27	o,o64	3,6
t12	$D8_1$	3o,54	o,268	8,8
	$D8_2$	21,78	o,o73	3,4
	$D8_3$	3,16	o,o13	4,1
	$D8_4$	24,1o	o,199	8,2
	$D8_5$	24,o8	o,2o4	8,5
	M	2o,73	o,151	6,6
	SD	1o,35	o,1o5	2,6
t18	$D8_1$	18,96	o,171	9,o
	$D8_2$	19,16	o,337	17,6
	$D8_3$	28,89	o,33o	11,4
	$D8_4$	21,78	o,321	14,8
	$D8_5$	25,93	o,3o8	11,9
	M	22,94	o,293	12,9
	SD	4,35	o,o69	3,3

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	D2P 1	8,71	o,o29	3,3
	D2P 2	1o,5o	o,o32	3,1
	D2P 3	siehe Verteilungen		
	D2P 4	6,74	o,o43	6,3
	D2P 5	7,28	o,o3o	4,2
	M	8,31	o,o33	4,2
	SD	1,68	o,oo6	1,5
t12	D2P 1	2,1o	o,oo5	2,5
	D2P 2	7,13	o,o46	6,5
	D2P 3	7,15	o,o46	6,4
	D2P 4	3,51	o,o1o	2,9
	D2P 5	6,67	o,o28	4,2
	M	5,31	o,o27	4,5
	SD	2,35	o,o19	1,9
t18	D2P 1	1o,76	o,o68	6,3
	D2P 2	9,78	o,o84	8,6
	D2P 3	1o,65	o,283	26,6
	D2P 4	16,92	o,473	28,o
	D2P 5	verstorben		
	M	12,o3	o,227	17,4
	SD	3,29	o,191	11,5

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	$D4P_1$	13,03	0,042	3,3
	$D4P_2$	6,15	0,041	6,6
	$D4P_3$	2,22	0,014	6,2
	$D4P_4$	7,36	0,037	5,1
	$D4P_5$	12,01	0,104	8,7
	M	8,15	0,048	6,0
	SD	4,43	0,034	2,0
t12	$D4P_1$	9,62	0,056	5,8
	$D4P_2$	6,37	0,043	6,7
	$D4P_3$	11,41	0,050	4,4
	$D4P_4$	13,97	0,077	5,5
	$D4P_5$	12,86	0,045	3,5
	M	10,85	0,054	5,2
	SD	2,99	0,014	1,2
t18	$D4P_1$	15,70	0,150	9,5
	$D4P_2$	21,51	0,260	12,1
	$D4P_3$	8,44	0,071	8,4
	$D4P_4$	9,89	0,319	32,3
	$D4P_5$	8,30	0,090	10,9
	M	12,77	0,178	14,6
	SD	5,74	0,108	10,0

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 x\ 10^{-3}$)
t6	D8P $_1$	12,35	o,o41	3,3
	D8P $_2$	13,4o	o,o76	5,7
	D8P $_3$	21,37	o,118	5,5
	D8P $_4$	14,81	o,o69	4,6
	D8P $_5$	12,56	o,o41	3,2
	M	14,9o	o,o69	4,5
	SD	3,74	o,o32	1,2
t12	D8P $_1$	18,81	o,o74	3,9
	D8P $_2$	44,o1	o,437	9,9
	D8P $_3$	43,83	o,25o	5,7
	D8P $_4$	9,13	o,o45	4,9
	D8P $_5$	9,18	o,1o2	11,1
	M	24,99	o,181	7,1
	SD	17,72	o,163	3,2
t18	D8P $_1$	22,96	o,295	12,8
	D8P $_2$	16,22	o,136	8,4
	D8P $_3$	33,19	1,244	37,5
	D8P $_4$	12,59	o,1o4	8,2
	D8P $_5$	1o,o7	o,115	11,4
	M	19,o1	o,379	15,7
	SD	9,3o	o,49o	12,4

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm ^{2}	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t18	$D2P5_1$	Präparate wegen techn. Mängel nicht auswertbar		
	$D2P5_2$	18,67	o,142	7,6
	$D2P5_3$	6,o7	o,o29	4,8
	$D2P5_4$	1o,96	o,o72	6,6
	$D25P_5$	4,15	o,o18	4,3
	M	9,96	o,o65	5,8
	SD	6,47	o,o56	1,5
t18	$D4P5_1$	28,oo	o,2oo	7,1
	$D4P5_2$	12,49	o,132	1o,6
	$D4P5_3$	13,19	o,137	1o,4
	$D4P5_4$	19,11	o,126	6,6
	$D4P5_5$	25,o2	o,228	9,1
	M	19,56	o,165	8,8
	SD	6,92	o,o46	1,8
t18	$D8P5_1$	23,79	o,283	11,9
	$D8P5_2$	37,o4	o,735	19,8
	$D8P5_3$	24,3o	o,325	13,4
	$D8P5_4$	14,67	o,153	1o,5
	$D8P5_5$	17,33	o,191	11,o
	M	23,43	o,337	13,3
	SD	8,66	o,233	3,8

Größenverteilungen : Vorbehandlung DÄNA 2 mg/ kg KG
Nachbehandlung Wasser

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7	93,8	1o5,7	4o,9	176,5
72,o	49,6	12o,4	184,9	187,3
1o2	28,4	51,7	186,3	172,1
145	3,o	17,8	46,8	1oo,3
2o7		2,6	2o,7	4o,8
294			1,5	16,2
417				2,8
593				o,7
842				
119o				
169o				
Summe	174.7	298.3	481.o	696.9

Vorbehandlung DÄNA 4 mg/ kg KG
Nachbehandlung Wasser

Durchmesser	Inseln/ cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7	1o2,9	213,1	353,6	4,7
72,o	45,4	468,8	6o4,1	364,4
1o2	12,6	232,4	377,6	3o2,8
145		64,7	142,6	15o,2
2o7	3,4	11,5	35,7	48,3
294	3,o	2,2	1,4	14,5
417				2,1
593				
842				
119o				
169o				
Summe	167,3	992,6	1515,1	886,9

Größenverteilungen : Vorbehandlung DÄNA 8 mg/kg KG
Nachbehandlung Wasser

Durchmesser (u) Inseln / cm^3

	to	t6	t12	t18
5o,7		291,8	372,7	
72,o	12o,4	335,8	956,2	529,o
1o2	65,7	317,8	898,8	58o,6
145	9,1	153,7	377,3	572,2
2o7	2,3	51,o	99,9	2o9,2
294		24,3	3o,5	51,8
417		3,o	2,2	11,3
593				
842				
119o				
169o				
Summe	187,5	1177,4	2537,5	1954,1

Vorbehandlung DÄNA 2, 4, 8 mg / kg KG
Nachbehandlung Wasser 12 Wochen
anschl. Phenob. 5 Wochen

Durchmesser (u) Inseln / cm^3

	2 mg	4mg	8 mg
5o,7	36,o	11,2	
72,o	3o6,9	663,4	426,o
1o2	366,2	854,o	817,2
145	138,5	342,6	487,3
2o7	36,o	81,7	2o8,5
294		14,8	58,4
417		5,1	12,5
593	o,7	o,8	5,o
842			
119o			
169o			
Summe	885,1	1973,5	2o14,8

Größenverteilungen : Vorbehandlung DÄNA 2 mg / kg KG
Nachbehandlung Phenobarbital

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3				
	to	t6	t12	t18	Tier 3, t6
5o,7	93,8	367,7	213,4	111,6	
72,o	49,6	62o,8	419,o	237,3	138o,1
1o2	28,4	271,3	146,o	3o9,3	132o,1
145	3,o	25,3	33,6	237,9	275,8
2o7		6,1	4,6	78,o	124,5
294			4,2	13,4	6,9
417		1,6		5,7	
593				9,7	
842				o,6	
119o					
169o					
Summe	174,7	1252,7	82o,8	1oo2,9	31o7

Vorbehandlung DÄNA 4 mg / kg KG
Nachbehandlung Phenobarbital

Durchmesser (u)	Inseln / cm^3			
	to	t6	t12	t18
5o,7	1o2,9	27,2	242,7	
72,o	45,4	593,8	643,4	271,8
1o2	12,6	34o,9	373,2	485,5
145		58,6	126,5	3o6,o
2o7	3,4	31,8	15,7	5o,6
294	3,o	2,9	1,4	14,6
417				1,5
593				1,3
842				o,5
119o				
169o				o,25
Summe	167,3	1o55,3	14o3,o	1132,o

Größenverteitungen : Vorbehandlung DÄNA 8 mg / kg KG

Nachbehandlung Phenobarbital

Durchmesser (u) Inseln / cm^3

	to	t6	t12	t18
5o,7		68,5	427,4	
72,o	12o,4	974,4	978,4	4o4,o
1o2	65,7	6o9,4	951,6	719,6
145	9,1	139,4	385,4	332,6
2o7	2,3	8,1	65,5	141,2
294		1,5	15,8	4o,2
417			3,6	13,o
593			1,4	5,o
842				1,9
119o				o,3
169o				o,3
Summe	197,5	18o1,3	2829,2	1658,4

Tier $D2P_3$, t 6 , wurde getrennt aufgeführt, da es außergewöhnlich stark auf Phenobarbital reagiert hat. Die ATPase- Aktivität im Zentralbereich war vollständig ausgefallen, und die Präparate zeigten eine große Anzahl enzymfreier Areale.

Tab. 3 : 7- wöchige Behandlung mit 12 mg/kg KG NNM im Trinkwasser, die Kontrolle erhielt Wasser. Nachbehandlung mit Wasser oder Phenobarbital in den Dosierungen o,75- 7,5 bzw. 75 mg/kg KG x die. Untersuchungszeitpunkte : 2, 6 und 18 Wochen nach Ende der NNM- Behandlung

	Vorbehandlung : Wasser			Nachbehandlung : Wasser
	Färbung : ATPase			
Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	%Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t2	1		keine Inseln	
	2	o,3o7	o,oo1	
	3		keine Inseln	
	4	o,493	o,oo2	
	5	o,4o2	o,oo1	
	6		keine Inseln	
	M	< o,4	< o,oo1	
	SD			
t6	1		keine Inseln	
	2	o,59	o,oo12	
	3	o,59	o,ooo4	
	4	1,18	o,oo17	
	5	1,18	o,oo16	
	6		keine Inseln	
	M	<1	<o,oo2	
	SD			

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl/cm^2	%Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t18	1	0,59	0,0006	
	2	0,59	0,0009	
	3	1,18	0,0086	
	4	0,59	0,0055	
	5	1,76	0,0072	
	6	0,59	0,0011	
	M	< 2	< 0,01	
	SD			

Vorbehandlung : Wasser — Nachbehandlung : Pheno.0,75

Färbung : ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	%Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1		keine Inseln	
	2		keine Inseln	
	3		keine Inseln	
	4	0,446	0,002	
	5		keine Inseln	
	6		keine Inseln	
	M	<1	<0,002	
	SD			
t18	1		keine Inseln	
	2	1,76	0,0080	
	3		keine Inseln	
	4	1,76	0,0046	
	5	3,53	0,0291	
	6	1,18	0,0018	
	M	< 2	< 0,01	
	SD			

Vorbehandlung: Wasser Nachbehandlung: Pheno. 7,5

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1		keine Inseln	
	2		keine Inseln	
	3		keine Inseln	
	4		keine Inseln	
	5	1,8	0,009	
	6		keine Inseln	
	M	<1	<0,002	
	SD			
t18	1	1,18	0,0046	
	2	2,35	0,0122	
	3	2,35	0,0051	
	4	1,76	0,0057	
	5	1,60	0,0087	
	6	0,59	0,0027	
	M	<2	<0,01	
	SD			

Vorbehandlung: Wasser — Nachbehandlung: Pheno. 75

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1		keine Inseln	
	2	0,59	0,0012	
	3	1,18	0,0036	
	4	1,18	0,0035	
	5		keine Inseln	
	6	0,59	0,0006	
	M	<1	<0,002	
	SD			
t18	1	1,18	0,0063	
	2	1,18	0,0034	
	3	0,59	0,0021	
	4	0,65	0,0012	
	5	1,76	0,0136	
	6	0,59	0,0025	
	M	<2	<0,01	
	SD			

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Wasser

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t2	1	2,96	0,036	12,16
	2	1,04	0,008	7,69
	3	1,63	0,037	22,70
	4	1,96	0,037	18,88
	5	1,28	0,017	13,28
	6	3,81	0,076	19,95
	M	2,11	0,035	15,78
	SD	1,07	0,023	5,65
t6	1	3,20	0,06	18,75
	2	2,24	0,02	8,93
	3	4,08	0,12	29,41
	4	2,83	0,05	17,67
	5	0,78	0,013	16,67
	6	0,57	0,009	15,79
	M	2,28	0,045	17,87
	SD	1,38	0,042	6,63
t18	1	9,46	0,62	65,64
	2	5,46	0,23	42,12
	3	9,36	0,62	66,24
	4	5,16	0,14	27,13
	5	17,45	2,24	128,37
	6	6,17	0,46	74,55
	M	8,84	0,72	67,33
	SD	4,62	0,77	34,74

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno. 0,75

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	2,79	0,05	17,92
	2	6,95	0,15	21,58
	3	9,96	0,22	22,09
	4	6,03	0,20	33,17
	5	2,72	0,07	25,74
	6	5,39	0,18	33,40
	M	5,64	0,145	25,65
	SD	2,73	0,007	6,41
t18	1	7,72	1,28	165,80
	2	15,02	3,04	202,40
	3	5,95	0,35	58,82
	4	3,26	0,23	70,55
	5	3,70	0,21	56,76
	6	13,11	1,62	123,57
	M	8,13	1,12	112,98
	SD	4,91	1,11	61,31

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno 7,5

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	4,84	0,095	19,63
	2	7,08	0,33	46,61
	3	3,09	0,07	22,65
	4	5,08	0,20	39,37
	5	1,35	0,04	29,63
	6	8,32	0,37	44,47
	M	4,96	0,18	33,73
	SD	2,54	0,14	11,41
t18	1	6,14	0,36	58,63
	2	7,41	0,46	62,08
	3	10,46	1,43	136,71
	4	11,22	1,75	155,97
	5	23,79	3,35	140,82
	6	7,18	0,69	96,10
	M	11,03	1,34	108,39
	SD	6,56	1,13	42,16

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno. 75

Färbung: ATPase

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	11,30	0,35	31,33
	2	3,79	0,12	32,45
	3	3,17	0,09	28,39
	4	5,73	0,16	28,62
	5	11,57	0,55	47,54
	6	1,79	0,02	12,85
	M	6,22	0,22	30,20
	SD	4,23	0,20	11,08
t18	1	38,68	3,72	96,17
	2	27,24	5,69	208,88
	3	14,47	0,62	42,85
	4	19,35	1,69	87,34
	5	10,68	0,96	89,89
	6	3,74	0,17	45,45
	M	19,03	2,14	95,10
	SD	12,47	2,14	60,38

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Wasser

Färbung: γ-GT

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t2	1	3,67	0,059	16,08
	2	3,37	0,037	10.98
	3	6,19	0,096	15,51
	4	4,80	0,098	20,42
	5	3,23	0,043	13,31
	6	5,87	0,138	23,51
	M	4,52	0,079	16,64
	SD	1,30	0,039	4,61
t6	1	4,56	0,074	16,23
	2	4,74	0,047	9,92
	3	4,26	0,080	18,78
	4	5,33	0,088	16,51
	5	1,95	0,027	13,85
	6	1,42	0,016	11,27
	M	3,71	0,055	14,43
	SD	1,62	0,030	3,38
t18	1	12,55	0,45	35,86
	2	16,49	0,41	24,86
	3	17,95	0,66	36,77
	4	10,42	0,16	15,36
	5	26,90	1,69	62,83
	6	13,32	0,45	33,78
	M	16,27	0,64	34,91
	SD	5,88	0,54	15,93

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno. 0,75

Färbung: γ-GT

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	4,03	0,043	10,67
	2	8,21	0,12	14,62
	3	11,96	0,16	13,38
	4	6,31	0,12	19,02
	5	5,86	0,076	12,97
	6	7,40	0,14	18,92
	M	7,30	0,11	14,93
	SD	2,69	0,043	3,38
t18	1	17,89	1,31	73,23
	2	30,04	2,19	72,90
	3	13,62	0,39	28,63
	4	8,82	0,38	43,08
	5	8,65	0,32	36,99
	6	25,28	1,77	70,02
	M	17,38	1,06	54,14
	SD	8,79	0,81	20,18

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno. 7,5

Färbung: γ-GT

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	5,42	0,069	12,73
	2	9,06	0,18	19,87
	3	5,11	0,068	13,31
	4	7,83	0,12	15,33
	5	3,52	0,052	14,77
	6	7,64	0,18	23,56
	M	6,43	0,11	16,60
	SD	2,08	0,06	4,24
t18	1	7,81	0,27	34,57
	2	12,73	0,29	22,78
	3	12,93	0,90	69,61
	4	16,91	1,21	71,56
	5	32,45	2,28	70,26
	6	9,44	0,57	60,38
	M	15,38	0,92	54,86
	SD	8,94	0,76	21,00

Vorbehandlung: NNM Nachbehandlung: Pheno. 75

Färbung: γ-GT

Zeitpkt.	Tier	Inselzahl	% Inselgewebe	Einzelinsel ($mm^2 \times 10^{-3}$)
t6	1	9,43	0,28	29,69
	2	3,88	0,09	23,20
	3	5,33	0,12	22,51
	4	6,87	0,19	27,66
	5	12,87	0,46	35,74
	6	2,71	0,02	7,38
	M	6,85	0,19	24,36
	SD	3,77	0,16	9,61
t18	1	72,20	3,27	45,29
	2	59,80	5,24	87,63
	3	25,88	0,68	26,28
	4	29,75	1,69	56,81
	5	19,81	1,09	55,02
	6	13,25	0,42	31,70
	M	36,78	2,07	50,46
	SD	23,64	1,86	21,94

Größenverteilungen: Vorbehandlung NNM 12 mg/kg KG
Nachbehandlung Phenobarb. in versch. Dosiergen.
Zeitpunkt: 2 und 6 Wochen nach Ende der NNM-Applikation
Färbung: ATPase

Durchmesser (µ) Inseln/cm^3

	t2 Wasser	t6 Wasser	t6 Ph 0,75	t6 Ph 7,5	t6 Ph 75
50,7					
72,0	10,2				
102	9,1	19,4	26,7	1,8	11,9
145	35,2	62,8	86,8	40,7	80,1
207	25,2	26,6	89,5	82,7	113,7
294	7,0	12,5	62,4	43,8	52,7
417		3,4	5,6	11,3	17,9
593		0,4	2,1	3,2	2,0
842					
1190					
1690					
Summe	87,2	131,5	284,6	183,5	187,2

Zeitpunkt: 6 Wochen nach Ende der NNM-Applikation
Färbung: γ-GT

Durchmesser (µ) Inseln/cm^3

	t6 Wasser	t6 Ph 0,75	t6 Ph 7,5	t6 Ph 75
50,7				
72,0			17,0	
102	33,8	168,5	110,3	30,7
145	114,2	174,4	142,9	103,0
207	81,0	95,6	89,6	100,8
294	19,3	20,4	22,6	60,4
417	0,6	3,5	4,4	7,3
593				1,7
842				
1190				
Summe	248,8	386,8	462,6	303,9

Größenverteilungen: Vorbehandlung NNM 12 mg/kg KG
Nachbehandlung Phenobarb. in versch. Dosierg.
Zeitpunkt: 18 Wochen nach Ende der NNM-Applikation
Färbung: ATPase

Durchmesser (µ) Inseln/cm^3

	Wasser	Ph 0,75	Ph 7,5	Ph 75
50,7				
72,0				
102				
145	61,0		10,7	42,5
207	82,7	36,1	37,6	137,9
294	73,8	51,1	108,0	182,6
417	47,8	47,5	68,7	144,6
593	17,8	36,4	31,8	66,8
842	2,8	10,0	10,7	18,3
1190	1,8	3,5	1,8	4,9
1690			0,4	1,1
Summe	287,6	184,7	269,8	612,4

Färbung: γ-GT

Durchmesser (µ) Inseln/cm^3

	Wasser	Ph 0,75	Ph 7,5	Ph 75
50,7				
72,0	50,4	12,5		
102	151,1	115,0	173,8	213,8
145	246,4	203,3	196,8	516,9
207	190,5	180,4	116,3	411,8
294	76,7	119,6	92,2	279,0
417	53,9	57,8	50,1	91,1
593	8,6	21,7	19,9	44,0
842	1,7	8,1	7,4	15,0
1190	0,6	1,4	0,5	2,1
1690			0,3	0,15
Summe	780,1	719,7	657,2	1597

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten :

Amelang, Andrzejewski, Badelt, Bechtelsheimer, Bennewitz, Bertrand, Bickel, Bleyl, Blohmke, Bock, Boenninghaus, Brandis, Bräutigam, Breuer, Claessen, Cotta, Dengler, Diehl, Doerr, Domenjoz, Dreikorn, Durst, Egli, von Eiff, Ernst, Fleischhauer, Flohr, Frommhold, Gänshirt, Garwegh, Gedigh, Genth, Gerhardt, Gill, Gross, Güttgemann, Haas, Häfner, Hahn, Hallerbach, Heene, Henning, Holm, Hunstein, Jaeger, Jambon, Janzarik, Knauss, Kommerell, Kubli, Kuhn, Kunz, Linder, Louven, Ma, Mani, Marquardt, Mathiopoulos, Mc Donald, Microvilli, Mirouze, Mosebach, Oberhoffer, Pera, Petzold, Pichotka, Piekarski, Pieper, Piotrowski, Plotz, Plückthun, Puech, Pujol, von Rad, Romieu, Rompe, Schaede, Schepank, Schettler, Schmidt, Scholtyseck, Schwabe, Sievers, Stierlin, Stoeckel, Thofern, Thurn, Totovic, Trede, Tur, Vollmann, Wartenberg, Weber, Weitbrecht, Werner, zum Winkel, Winkler, Wirsching, Wittkowski, Zeh, Zilleken .

LEBENSLAUF

20. 06. 54	geboren in Göttingen als Sohn des Toxikologen Prof. Dr. Dietrich Lorke und der Ärztin Dr. Irmela Lorke, geb. Volkmann
1961 - 1965	Grundschule Wuppertal
1965 - 1973	Staatlich-Naturwissenschaftliches Gymnasium, Wuppertal
Juni 1973	Abitur
Oktober '73 - Sep. '76	Medizinstudium an der Rhein. Friedrich-Wilhelm-Universität in Bonn
August 1975	Ärztliche Vorprüfung in Bonn
August 1976	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Bonn
Oktober '76 - Sep. '77	Auslandsstudium als Stipendiat der Studienstiftung des Dt. Volkes an der Medizinischen Fakultät in Montpellier
Oktober '77 - April'81	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg
Juli - Okt. 1978	Auslandsfamulatur am Princess Margret Hospital for Children in Perth, W. Australia, als Stipendiat des Deutschen Akad. Austauschdienstes
März 1980	2. Teil der Ärztlichen Prüfung in Heidelberg
April 1980 - Apr.'81	Praktisches Jahr an dem Städt. Klinikum Mannheim und am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in den Gebieten Innere Medizin, Chirurige und Psychiatrie
15. 04.'81	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Jan. 1978 - Juli'82	Experimentelle Doktorarbeit bei Prof. Dr. W. Kunz am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, Abteilung für Molekulare Toxikologie